

Funktionelle Charakterisierung potenzieller Exportsignale und Interaktionen innerhalb der IAP-Familie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von Rouven Hecht

aus Gelsenkirchen

April 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Molekularbiologie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Shirley Knauer
2. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Schulte
3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Burda

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1 Krebs	5
1.2 Karzinogenese	8
1.3 Apoptose	10
1.3.1 Extrinsischer Signalweg der Apoptose	14
1.3.2 Intrinsischer Signalweg der Apoptose	14
1.4 Caspasen	15
1.5 Inhibitoren der Apoptose (IAPs)	16
1.5.1 Survivin	18
1.5.2 XIAP	20
1.5.2.1 XAF1	21
1.5.3 Livin	22
1.6 Nukleo-Zytoplasmatischer Transport	23
1.6.1 Kernexport/ Crm1	27
1.6.2 Crm1-Inhibitoren	30
1.7 Zielsetzung	32
2. Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	33
2.1.2 Kits	33
2.1.3 Puffer und Lösungen	33
2.1.4 Antibiotika	34
2.1.5 Antikörper	34
2.1.6 Oligonukleotide	35
2.1.7 Vektoren	37
2.1.8 Bakterienstämme und Kulturbedingungen	40
2.1.9 Zelllinien	41
2.1.10 Software/ Computergestützte Analysen	41
2.2 Methoden	41
2.2.1 Zellbiologische Methoden	41
2.2.1.1 Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	41

2.2.1.2 Plasmidisolierung aus Bakterien	42
2.2.1.3 Kultivierung eukaryontischer Zellen	42
2.2.1.4 Zellpassage	43
2.2.1.5 Mykoplasmenkontrolle	44
2.2.1.6 Eliminierung von Mykoplasmen	44
2.2.1.7 Langfristige Lagerung von Zellen	44
2.2.1.8 Auftauen von Zellen	45
2.2.1.9 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen	45
2.2.1.10 Leptomycin B-Behandlung von adhärenen Zellen	45
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	46
2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	46
2.2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	47
2.2.2.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	47
2.2.2.5 DNA-Restriktion und –Ligation	47
2.2.2.6 Oligoannealing	48
2.2.2.7 Sequenzanalyse	48
2.2.3 Biochemische Methoden	48
2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten	48
2.2.3.2 <i>In vitro</i> -Translation	49
2.2.3.3 <i>Pulldown</i>	49
2.2.3.4 Ko-Immunpräzipitation	50
2.2.3.5 Fraktionierung von Zelllysaten	50
2.2.3.6 Proteinquantifizierung nach Bradford	51
2.2.3.7 SDS-PAGE	51
2.2.3.8 Western-Blot (Tank Blot)	52
2.2.3.9 Entfernen von an Membranen gebundenen Antikörpern	53
2.2.3.10 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	54
2.2.3.11 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	54
2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie	55
2.2.4.1 Epi-Fluoreszenzmikroskopie	55
2.2.4.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	56
2.2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung	56
2.3 Mikroinjektion	57

3. Ergebnisse	58
3.1. Lokalisationsanalyse des Apoptose-Inhibitorproteins XIAP	58
3.1.1.1 Chemische Exportinhibition	58
3.1.1.2 Expression des Apoptose-Inhibitorproteins XIAP	60
3.1.1.3 Lokalisationsanalyse von endogenem XIAP	60
3.1.1.4 Zelluläre Fraktionierung vor und nach LMB-Behandlung	62
3.1.1.5 Interaktion von XIAP und dem Exportrezeptor Crm1	63
3.1.1.6 Interaktionsanalyse von XIAP und dem Exportrezeptor Crm1	64
3.1.2 Eingrenzung eines möglichen nukleären Exportsignals in XIAP	64
3.1.2.1 <i>In silico</i> -Sequenzanalyse von XIAP	65
3.1.2.2 XIAP-Konstrukte zur Verifizierung des Exportsignals	67
3.1.2.3 Lokalisationsanalyse der N-/ C-terminalen XIAP-GFP Konstrukte	68
3.1.2.4 Lokalisationsanalyse der N-/ C-terminalen GST-XIAP-GFP Konstrukte	69
3.1.2.5 Lokalisationsanalyse der XIAP-GFP Konstrukte F1-F5	70
3.1.2.6 Lokalisationsanalyse der GST-XIAP-GFP Konstrukte F1-F5	71
3.1.2.7 Bakterielle Expression der GST-XIAP-GFP Konstrukte F1-F5	72
3.1.2.8 Mikroinjektionen	73
3.1.2.9 Interaktionsanalyse der XIAP-GFP Konstrukte F1-F5 mit Crm1	75
3.1.3 Funktionsanalyse von XIAP und dessen Interaktionspartnern	76
3.1.3.1 Lokalisationsanalyse von kotransfiziertem XIAP und Survivin	76
3.1.3.2 Lokalisationsanalyse von XAF1 nach LMB-Behandlung	78
3.1.3.3 Lokalisationsanalyse von kotransfiziertem XIAP und XAF1	79
3.2. Analyse eines möglichen Zusammenspiels von Survivin und anderen IAPs	80
3.2.1 Lokalisationsanalyse von kotransfiziertem Livin und Survivin _{WT} / Survivin _{NESMT}	80
3.2.2 Biochemische Interaktionsanalyse von Livin und Survivin	81
3.2.3 Interaktionsanalyse von Livin und Survivin <i>in vitro</i>	82
3.2.4 Expression des Apoptose-Inhibitors Livin	84
3.2.5 Livin-Deletionskonstrukte für Funktions- und Interaktionsanalysen	84
3.2.6 Lokalisationsanalyse von tLivin _{short} und tLivin _{long}	85
3.2.7 Lokalisationsanalyse von tLivin _{short} und tLivin _{long} mit Organellmarker für den Golgi-Apparat	86
3.2.8 Lokalisationsanalyse von tLivin _{short} und tLivin _{long} mit Organellmarker für das ER	88
3.2.9 Lokalisationsanalyse der Livin-Konstrukte nach Kotransfektion mit Survivin	90
3.2.10 Interaktionsanalyse von tLivin _{short} und tLivin _{long} mit Survivin	91

3.2.11 Lokalisationsanalyse von Livin nach Kotransfektion mit Caspase-3	92
3.2.12 Lokalisationsanalyse von Livin nach Kotransfektion mit Caspase-3 in Survivin stabilen A431-Zellen	94
4. Diskussion	96
4.1 Identifikation eines möglichen Exportsignals in XIAP	96
4.1.1 Lokalisationsanalyse von XIAP	97
4.1.2 Eingrenzung eines möglichen Exportsignals in XIAP	99
4.1.3 Funktionsanalyse von XIAP und dessen Interaktionspartnern	102
4.2 Interaktion von Survivin mit anderen IAPs am Beispiel von Livin	104
4.2.1 Lokalisationsanalyse von Livin und Survivin	104
4.2.2 Analyse der trunkierten Formen von Livin	105
4.2.3 Wirkung von Survivin auf die trunkierten Formen von Livin	107
4.2.4 Einfluss von Survivin auf die Spaltung von Livin durch Caspase-3	108
5. Anhang	110
5.1 Abkürzungsverzeichnis	110
5.2 Symbole für Aminosäuren	115
5.3 Abbildungsverzeichnis	116
5.4 Tabellenverzeichnis	118
5.5 XAF1 Proteinsequenz/ Isoform 1	118
5.6 Plasmid-Karten	119
5.7 Ncbi Gene Accession Numbers der verwendeten Sequenzen	122
5.8 Veröffentlichungen	122
5.9 Vorträge	123
5.10 Poster	123
5.11 Danksagung	124
5.12 Eidesstattliche Erklärungen	125
5.13 Lebenslauf (CV)	126
5.14 Literaturverzeichnis	129

Zusammenfassung

Apoptose ist ein stark regulierter Prozess, welcher von einer Vielzahl pro- und anti-apoptotischer zellulärer Proteine reguliert wird. Neben den pro-apoptotischen Caspasen spielen hier die anti-apoptotischen Mitglieder der IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*)-Familie eine wichtige Rolle. Sie sind hochkonserviert und wurden neben den Vertebraten auch in Insekten und Hefen beschrieben (Crook *et al.* 1993). Im Menschen konnten bislang acht Mitglieder dieser Familie identifiziert werden, von denen Survivin und XIAP die am besten untersuchten IAPs sind, da ihnen essentielle Funktionen im Verlauf der Karzinogenese zugesprochen werden (Dohi 2004, Mehrotra *et al.* 2010). Auf Grund seiner postulierten anti- und pro-apoptotischen Eigenschaften ist mit Livin ein weiteres IAP in den Fokus der Tumorforschung gerückt (Boaz Nachmias 2003).

Abgesehen von seiner Funktion als Apoptose-Inhibitor ist Survivin im Verlauf der Zellteilung für eine korrekte Verteilung der Chromosomen verantwortlich, in dem es als Teil des CPC für dessen Anlagerung an die Zentromere sorgt. Dies geschieht über ein hydrophobes Leucin-reiches Exportsignal (NES), welches in der Sequenz von Survivin verankert ist. Dadurch wird die Interaktion mit dem Exportrezeptor Crm1 ermöglicht, welche für die Bindung des CPC an die Chromosomen essentiell ist (Knauer *et al.* 2007). Wie für Survivin sind auch für XIAP nicht nur regulatorische Prozesse innerhalb der Apoptose beschrieben. XIAP ist ebenso involviert in die Aktivierung von Nf- κ B, JNK und die Aufrechterhaltung des Kupfer-Metabolismus (Galbán und Duckett 2009). Anlässlich dieser Multifunktionalität sollte im ersten Teil dieser Arbeit XIAP auf das Vorhandensein eines NES hin untersucht werden, welches ein wichtiger Bestandteil für die Ausführung seiner zellulären Aufgaben ist.

Dabei konnte durch LMB-Behandlung und die daraus folgende Akkumulation im Zellkern in der Tat auf die Existenz eines NES in XIAP geschlossen werden. Durch *in silico*-Sequenzanalysen und mittels Mikroinjektionsexperimenten sowie umfassenden molekularbiologischen und biochemischen Analysen wurde dies nicht nur bestätigt, sondern weist sogar auf eine mögliche kombinatorische Wirkung von mehreren potenziellen NES in XIAP hin. Während Interaktionsstudien indes die Abhängigkeit des intrazellulären Transports von einer möglichen Wechselwirkung mit Survivin nahezu ausschließen konnten, deutet die publizierte intranukleäre Akkumulation von XIAP in Verbindung mit XAF1 auf eine Interaktion dieser beiden Proteine hin (Peter Liston und Tamai 2001). Das in dieser Beziehung neu beschriebene NES in XAF1 kann in diesem Zusammenhang ebenfalls zum nukleären Export von XIAP beitragen. So könnte die Exportinhibition durch LMB nicht nur den Transport von XIAP selbst, sondern darüber hinaus auch von XAF1 einschränken.

Weitere Untersuchungen könnten klären, ob die Translokation von XAF1 ebenfalls von einer Interaktion mit Crm1 abhängt und welchen Einfluss eine siRNA-basierte Verminderung der XAF1-Expression auf die subzelluläre Lokalisation von XIAP hat und umgekehrt.

Um besser zu verstehen, wie Survivin als Apoptose-Inhibitor agiert, wurden im Rahmen dieser Arbeit mögliche Wechselwirkungen mit anderen IAPs untersucht. Anhand von Ko-Immunpräzipitationsanalysen konnte erstmalig gezeigt werden, dass Survivin neben der bereits beschriebenen Interaktion mit XIAP auch an Livin zu binden vermag. Um die funktionelle Relevanz dieser Interaktion verstehen zu können, wurde zunächst die pro-apoptotische Eigenschaft von Livin genauer untersucht. Dabei wurde bestätigt, dass u.a. Caspase-3 für die proteolytische Spaltung von Livin verantwortlich ist und so das pro-apoptotisch wirkende C-terminale Fragment entsteht, welches in einer perinukleären Ringstruktur im endoplasmatischen Retikulum akkumuliert (Boaz Nachmias 2003, Nachmias *et al.* 2007). Weiterführende Versuche wiesen eine stärkere Bindung von Survivin an die C-terminale Livin-Variante als an den Wildtyp nach. Dies deutet vermehrt auf eine anti-apoptotische Wirkweise von Survivin hin, welche über die pro-apoptotische Eigenschaft von tLivin_{long} vermittelt wird. Dies führte zu der Hypothese, dass eine Hochregulation von Survivin und Livin in frühen Phasen der Tumorentwicklung, zu einer Stabilisierung von Livin durch Survivin führt und es so nicht in mehr seine pro-apoptotische Form gespalten werden kann.

Einen Hinweis darauf gab die Kotransfektion von Livin und Caspase-3 in Survivin konstitutiv exprimierenden A431-Zellen, in denen Livin im Vergleich zu den entsprechenden parental Zellen, nicht mehr prozessiert wurde und seinen anti-apoptotischen Phänotyp beibehielt. Die Prozessierung von Livin wird normalerweise durch Caspase-3 vermittelt, welche wiederum durch die Überexpression von Survivin gehemmt werden kann.

Weiterführende Experimente sollten sich neben der Aufklärung der Apoptose-induzierenden Mechanismen der C-terminalen Spaltform von Livin im ER und mit der Analyse zellulärer Vitalität in Abhängigkeit der transfizierten Livin-, Survivin- und Caspase-3-Konstrukte beschäftigen.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit neue Einblicke in die pro-apoptotische Wirkung von Livin geben und durch die Entdeckung einer bislang unbekannten Interaktion mit Survivin einen neuen Aspekt in dessen biologischer Funktion aufdecken. Des Weiteren wurden erste Hinweise auf die Existenz eines Exportsignals in der Sequenz von XIAP sowie auf eine relevante, bisher unbekannte Verbindung zu XAF1 gewonnen. Dies eröffnet nun neue Wege im Verständnis der Multifunktionalität von XIAP.

Summary

The process of apoptosis is a tightly controlled mechanism which is regulated by a high number of different pro- and anti-apoptotic cellular proteins. Besides the pro-apoptotic Caspases, the highly conserved family of intracellular inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) play an important role. Eight members have been identified in humans so far, yet they are also found in insects, yeast and a wide range of vertebrates (Crook *et al.* 1993). Due to their pivotal role in the carcinogenesis, Survivin and XIAP are the two best studied IAPs (Dohi 2004, Mehrotra *et al.* 2010). However, due to its ability to act as both anti- and pro-apoptotic factor during early stages of apoptosis, the small IAP Livin has also come into focus of many cancer related studies (Boaz Nachmias 2003).

Besides its function as an inhibitor of apoptosis, Survivin plays also an important role during mitosis as part of the CPC ensuring the correct distribution of the chromosomes. This is mediated via an intrinsic hydrophobic, leucine-rich export signal (NES) in Survivin, which is essential for interaction with the export receptor Crm1 and the tethering of the CPC to the centromeres (Knauer *et al.* 2007). Similar to Survivin, also XIAP is not merely known as a regulator of apoptosis. It is also involved in several processes like NF- κ B and JNK activation and the maintenance of copper metabolism (Galbán und Duckett 2009). Due to this multifunctionality, the first part of this work aimed to define whether XIAP might contain a so far unknown NES and to evaluate its localization and possible importance for the proper cellular function of XIAP.

LMB-treatment of Hela cells transiently transfected with pc3-XIAP_{WT}-GFP resulted in a significant protein accumulation in the nucleus. This served as a first hint for the existence of NES in XIAP. *In silico* sequence analyzes and microinjection experiments in combination with comprehensive molecular and biochemical methods not only confirmed the existence of the predicted export signal, but also pointed towards a possible combinatorial effect of several potential NES in XIAP. Whereas interaction studies nearly excluded the possibility of an interdependence of intracellular transport and an interaction with Survivin, the published nuclear accumulation of XIAP connected with XAF1 indeed indicates an interaction between these two proteins (Peter Liston und Tamai 2001). In this context, the newly described NES in XAF1 could also contribute to the nuclear export of XIAP. Accordingly, inhibition of nuclear export by LMB would not only affect the transport of XIAP itself but also nuclear export of XAF1.

To achieve a better understanding of how Survivin acts as an apoptosis regulator, we investigated its possible interplay with other IAP-members. In immunoprecipitation experiments we could demonstrate for the first time that there is not only an interaction between Survivin and XIAP but also between Survivin and Livin. In order to clarify the functional relevance of this interaction, at first, Livin's pro-apoptotic property was investigated

in more detail. It could be confirmed that Caspase-3 is responsible for the proteolytical cleavage of Livin into its pro-apoptotic C-terminal fragment, which accumulates in a ring-like structure around the nucleus corresponding to the endoplasmic reticulum (Boaz Nachmias 2003, Nachmias *et al.* 2007). Ensuing experiments showed a higher binding affinity of Survivin to the C-terminal variant compared to the wildtype. This points to an additional anti-apoptotic activity of Survivin, which is mediated via the formation of tLivin_{long}. This in turn raises the hypothesis of a correlated protein up-regulation of Survivin and Livin in early stages of tumor development, where Survivin might stabilize Livin by binding and thus prevents it from cleavage into its assumed pro-apoptotic truncated C-terminal form. This hypothesis could be verified by co-transfection experiments showing that Livin was processed into its pro-apoptotic form when transfected together with Caspase-3 in parental A431 cells but not in cells stably overexpressing Survivin, which in turn is able to inhibit Caspase-3.

In summary, the results of this work could give new insights into the pro-apoptotic effects mediated by Livin and via the discovery of a so far unknown interaction with Survivin unravel a new aspect in its biological function. Additionally, data hint towards the existence of a nuclear export signal in XIAP and support a so far unknown connection to XAF1. This now paves the way to better understand the multifunctionality of XIAP.

1 1.Einleitung

1.1 Krebs

Funde aus der frühen Erdgeschichte belegen, dass seit Leben auf der Erde besteht, auch Krebs existiert (Hajdu 2011). Die ersten schriftlichen Überlieferungen des Edwin Smith Papyrus, sind auf 3000 v. Chr. datiert und beschreiben zum ersten Mal eine Art von Brusttumor (Hajdu 2011). Im weiteren Verlauf der Geschichte folgen weitere Belege aus verschiedenen Kulturen, in welchen von zahlreichen Krebs-Variationen (Brust, Darm, Haut usw.) die Rede ist (Hajdu 2012).

Der griechische Arzt Hippokrates (460-375 v. Chr.) definierte als Erster den Begriff „Krebs“ bzw. „Karzinom“, im griechischen: „*Karkinos*“, da ihn die Art und Weise in der solide Tumore wuchsen, an das Aussehen und die Bewegung eines Krebses erinnerte. Der Physiker Celsius (25-50 v. Chr.) leitete daraus später das lateinische Wort „*Cancer*“ ab (Hajdu 2011).

Mit europaweit 8,2 Millionen Todesfällen im Jahr 2012, stellen Krebserkrankungen laut Weltgesundheitsorganisation (WHO), die zweithäufigste Todesursache dar. Nur kardiovaskuläre Todesfälle, liegen mit 9,4 Millionen allein in Europa, noch darüber (WHO 2012). Im Jahr 2008 gab es weltweit bis zu 12,7 Millionen Neuerkrankungen und bis 2010 starben nahezu 8 Millionen Menschen an den Folgen von Krebs (Lozano *et al.* 2012). In Deutschland zeigen die Krebsstatistiken mit bis zu 490.000 Neuerkrankungen und 221.000 Todesfällen pro Jahr einen stetigen Anstieg. Im Jahr 2011 lagen auch hier Tumorerkrankungen hinter Herz-Kreislauferkrankungen auf Platz zwei der Todesursachen (Abb. 1).

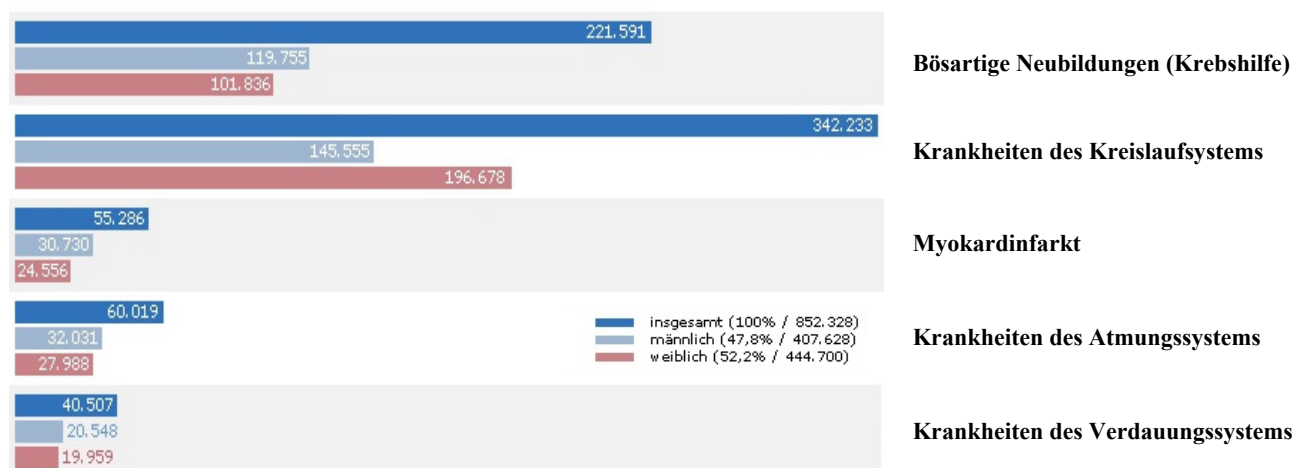


Abb. 1 – Die häufigsten krankheitsbedingten Todesursachen in Deutschland

Krankheiten des Herz- Kreislaufsystems sind verantwortlich für die meisten Todesfälle im Jahr 2011. Krebs, sog. bösartige Neubildungen, liegen auf dem zweiten Platz. Die Abbildung wurde modifiziert nach einer Erhebung Statistischen Bundesamtes (Quelle: *Statistisches Bundesamt, Wiesbaden*).

Auf Grund der immer älter werdenden Bevölkerung rechnen Experten in den nächsten 40 Jahren mit einer Steigerung der Krebserkrankungen von bis zu 30 % (Krebshilfe 2013). Zu den häufigsten Krebserkrankungen bei Männern gehört mittlerweile Prostatakrebs (26,1 %), dicht gefolgt von Tumoren der Atemwege mit 13,9 % und kolorektalen Tumoren (13,4 %) (Abb. 2). Bei Frauen ist Brustkrebs mit 31,3 % die am häufigsten auftretende Krebserkrankung, die Erkrankungswahrscheinlichkeit liegt hier bei 8 %. An zweiter Stelle stehen kolorektale Tumore (12,7 %), gefolgt von Lungen- (7,6 %) und Tumoren des Gebärmutterkörpers (5,1 %) (Abb. 2). Insgesamt betrachtet, tritt die höchste Mortalitätsrate beim Mammakarzinom auf (17 %), gefolgt von kolorektalen Tumoren (13 %) und Lungenkrebs (11 %) (Ferlay J 2013).

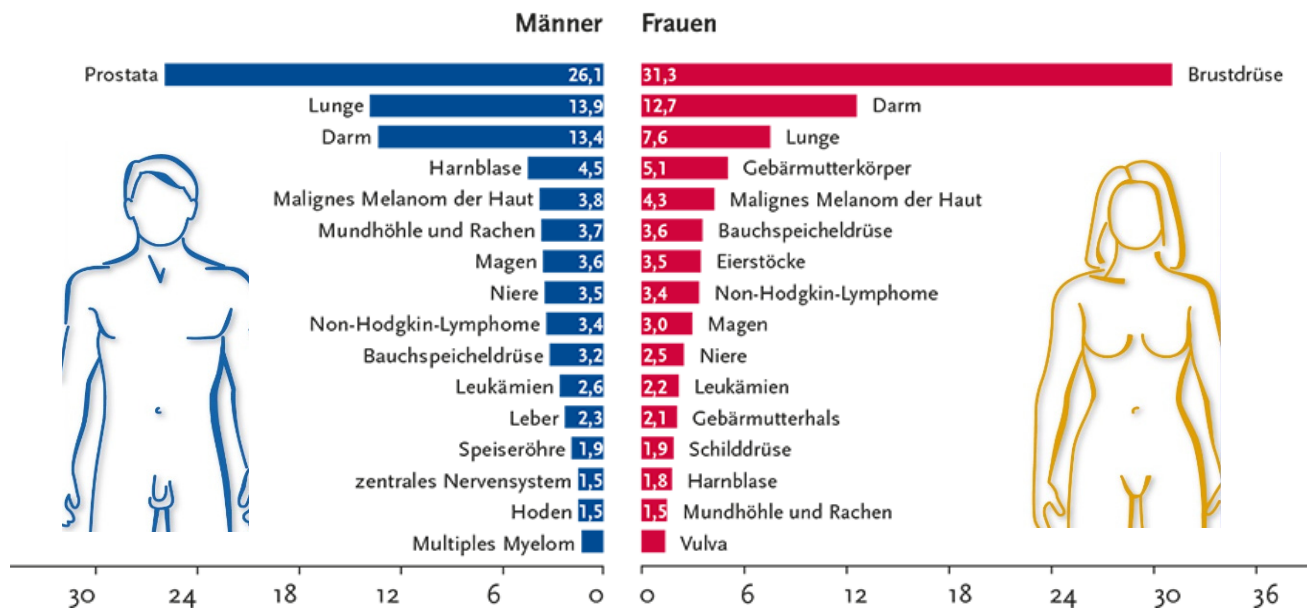


Abb. 2 – Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsfällen in Deutschland

Dargestellt ist die geschlechterspezifische Häufigkeit verschiedener Tumorarten in Abhängigkeit ihrer Lokalisation im Jahr 2010. Männer erkrankten primär an Prostatakrebs (26,1 %), gefolgt von Tumoren der Atemwege (13,9 %) und Darmkrebs (13,4 %). Frauen hingegen sind am anfälligsten für Brustkrebs (31,3 %), gefolgt von Darmkrebs (12,7 %). Allerdings findet sich hier Lungenkrebs an dritter Stelle (7,6 %). Abbildung modifiziert nach dem statistischen Bundesamt und dem Robert Koch-Institut. (*Quelle: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden und Robert Koch-Institut, Berlin*).

Aufgrund der stetigen Zunahme der Krebsfälle mit Todesfolge spricht man bei Krebs meist von einer „tödlichen“ Krankheit. Mehr als die Hälfte aller Patienten sterben durch die Krankheit selbst (Metastasierung) oder die Behandlung (Jemal *et al.* 2011). Umso wichtiger ist die Prävention von Krebs, die primär eine aktive Maßnahme eines jeden selbst sein muss (Mayo-Clinic 2010). Äußere Risikofaktoren wie Tabakkonsum, Übergewicht, Alkohol und Umweltverschmutzung könnten bewusst vermieden, und so das Krebsrisiko um bis zu 30 % gesenkt werden (Danaei *et al.* 2005). Dennoch sind nicht alle externen Einflüsse kontrollierbar, wodurch ein gewisses Risiko immer bestehen bleibt (WHO 2012). Daher gewinnen Faktoren wie Früherkennung und rechtzeitige Behandlung immer mehr an Bedeutung. Unter optimalen Bedingungen können wachsenden Tumore erkannt werden, noch bevor einschlägige Symptome aufkommen (NCI 2013).

Zu den gängigsten Behandlungsmethoden, zählen neben dem primären chirurgischen Eingriff, die Chemo- und Strahlentherapie. Die operative Entfernung des Tumors ist meist der erste Behandlungsschritt und führt in vielen Fällen zu positiven Resultaten. Bei vielen verschiedenen Tumorarten, wie z.B. Brust- und Hodenkrebs, werden zusätzlich zur mechanischen Resektion des Tumors chemotherapeutische Maßnahmen ergriffen, deren systematischer Einsatz jedoch oft durch ihre toxischen Wirkungen auf den Körper limitiert sind (Holland 2000).

Da bei der Entstehung von Krebs multiple Faktoren zusammenspielen, wird keine einzelne Methode zur Heilung ausreichen, genauso wie nicht nur eine Behandlungsart für alle Infektionskrankheiten existiert (Wanjek, 2006).

Tumore können sich aus unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen entwickeln. Trotz der hohen Variabilität an Gründen für die Entstehung von Krebs ist dieser generell als Erkrankung zu sehen, bei der es zu vielfältigen Fehlern im Wachstumsverhalten bzw. der Genregulation normaler Zellen kommt, welche in der Folge zu Tumorzellen transformieren (Karzinogenese) (Croce 2008).

1.2 Karzinogenese

Der Begriff der Karzinogenese beschreibt die Transformation von normalen, gesunden Zellen zu Tumorzellen. Dieser Prozess ist durch eine Vielzahl an zellulären Veränderungen auf genetischer und epigenetischer Ebene charakterisiert und führt zunächst zu einer unkontrollierten Zellteilung und gleichzeitiger Unterdrückung des Zelltods (Apoptose). Die daraus entstehende Zellmasse wird Tumor genannt (Fearon und Vogelstein 1990). Im normalen Gewebe herrscht ein empfindliches Gleichgewicht zwischen der Produktion und der Ausschüttung von Zellteilungssignalen, welche der Zelle den Eintritt in den Zellzyklus ermöglichen und einen ordnungsgemäßen Ablauf der Zellteilung gewährleisten (Hanahan und Weinberg 2011). Die meist auftretenden Veränderungen in Tumorzellen sind u.a. Punktmutationen, Genamplifikationen oder chromosomale Translokationen. Drei Klassen von Genen sind in diesem Zusammenhang besonders gut charakterisiert: Onkogene, Tumor-Suppressor-Gene und Stabilitäts-Gene. Onkogene entstehen aus sog. Proto-Onkogenen, die durch eine Mutation dauerhaft angeschaltet werden oder für ein konstitutiv aktives Protein kodieren (*gain-of-function*). Eine solche Aktivierung resultiert in den meisten Fällen aus chromosomalen Translokationen oder Genamplifikationen. Tumor-Suppressor-Gene hingegen kodieren für Proteine deren Aufgabe die Unterdrückung des Wachstums von entarteten Zellen ist. Hier führen Mutationen zu reduzierter oder fehlender Aktivität (*loss-of-function*). Ein wichtiger Begriff in diesem Zusammenhang ist der Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity; LOH*), welche in den meisten Fällen auf *Missense*-Mutationen, Insertionen sowie durch epigenetische Stilllegung einzelner chromosomaler Abschnitte zurückzuführen sein kann und exemplarisch für hereditäre Tumorformen wie HNPCC (hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom) der Fall ist (Weinberg 2014). Stabilitätsgene kodieren für DNA-Reparatur-Proteine und reduzieren genetische Veränderungen auf ein Minimum, sodass eine Inaktivierung dieser Proteine eine Akkumulation von Mutationen in anderen Genen begünstigt. Dies fördert indirekt das Tumorwachstum (Vogelstein und Kinzler 2004). Die am häufigsten veränderten Proteine im Verlauf der Krebsentstehung sind Wachstumsfaktoren, Regulatoren des Zellzyklus und Proteine der Signalweiterleitung (Futreal *et al.* 2004).

Im Gegensatz zur anfänglich beschriebenen Karzinogenese, welche in drei Teilschritte untergliedert wurde (Initiation, Promotion und Progression), deckten aktuellere Forschungen eine derartige Komplexität in der Tumorentstehung auf, dass heute von einem „Mehrstufenmodell“ der Krebsentstehung die Rede ist (Hanahan und Weinberg 2000, Wörth 2000). Das Modell der „*Hallmarks of Cancer*“ soll dabei helfen, die einzelnen Aspekte in der stufenweisen Entwicklung von Tumoren und deren Ursachen genauer zu verstehen (Abb. 3) (Hanahan und Weinberg 2000).

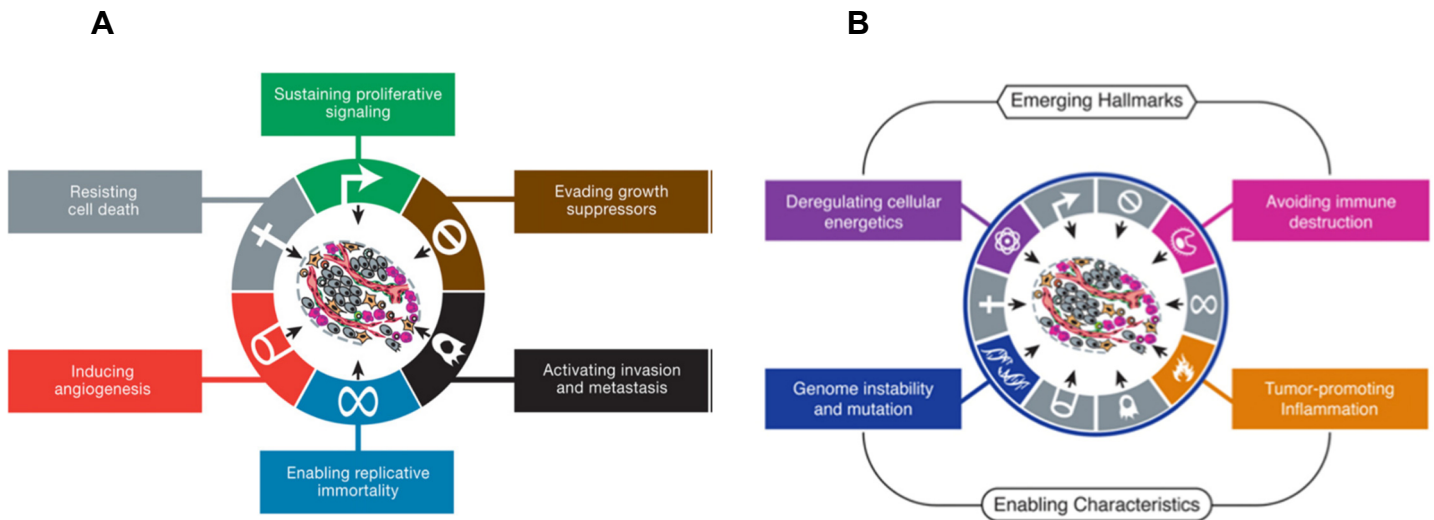


Abb. 3 – Schematische Darstellung der erworbenen Eigenschaften von Krebszellen

Gezeigt sind die ursprünglich im Jahr 2000 postulierten erworbenen Eigenschaften von Krebszellen (*Hallmarks of Cancer*) nach Hanahan und Weinberg (A), sowie die im Jahr 2011 ergänzten unterstützenden Charakteristika (B). Weitere Erläuterung siehe Text. (Hanahan und Weinberg 2000, Hanahan und Weinberg 2011).

Im Jahre 2000 beschrieben Hanahan und Weinberg zum ersten Mal sechs biologische Eigenschaften, welche (nahezu) jeden Tumor charakterisieren (Hanahan and Weinberg 2000). Zu diesen Eigenschaften zählen die Unabhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, die Vermeidung der Apoptose, die unlimitierte Fähigkeit zur Replikation (Immortalisierung), eine ausreichende Tumorangiogenese (Versorgung mit Blutgefäßen) sowie die Metastasierung und Invasion von Tumorzellen in fremdes Gewebe (Abb. 3A). Im Jahr 2011 addierten sich zu diesen noch die Umprogrammierung des zellulären Energiestoffwechsels zur Unterstützung von andauerndem Wachstum und Vermehrung, eine Instabilität des Genoms, sowie darin akkumulierte Mutationen, die Vermeidung der Zerstörung der Zelle durch das Immunsystem sowie tumorfördernde Entzündungsreaktionen (Abb. 3B) (Hanahan and Weinberg 2011). Die Ansammlung dieser, durch Mutationen erworbenen Attribute erfolgt wie bereits erwähnt in einem mehrstufigen Prozess, der als Tumorgenese bezeichnet wird. Damit es zur Tumorentstehung kommt, bedarf es jedoch keiner chronologischen Abfolge dieser Veränderungen.

Weiterhin konnte Bereits im Jahre 2009 gezeigt werden, dass Entzündungsreaktionen nahezu jeden Aspekt der Krebsentwicklung beeinflussen (Mantovani und Pierotti 2008, Colotta *et al.* 2009). Ebenso spielt insbesondere das Umfeld des Tumors, die sogenannte

Tumormikroumgebung, eine entscheidende Rolle in der Krebsentwicklung. 2011 postulierten Hanahan und Weinberg, dass ein Tumor nicht nur als Masse von Krebszellen gesehen werden kann, sondern in seiner Komplexität mit normalem Gewebe verglichen werden muss. Daraufhin konnten eine Vielzahl von Zelltypen wie z.B. Tumor-assoziierte Fibroblasten, Perizyten, endotheliale Zellen, Immunzellen, invasive Krebszellen und Krebsstammzellen als zu einem soliden Tumor zugehörig beschrieben werden (Hanahan und Weinberg 2011). Auf Grund der großen Bedeutung des Zellüberlebens und somit auch des Zellsterbens soll der Aspekt der Apoptose im nächsten Abschnitt definiert und genauer beschrieben werden.

1.3 Apoptose

Forscher beschäftigen sich seit Dekaden mit der Thematik des programmierten Zelltods, der sogenannten Apoptose, da es sich bei ihr um die letzte natürliche Barrikade handelt, welche den Organismus vor Krebs schützt (Evan und Littlewood 1998). 1842 beschrieb Carl Vogt zum ersten Mal das Auftreten von Apoptose, bevor Walther Flemming 1885 eine präzisere Definition des programmierten Zelltods publik machte. Doch letztendlich war es 1972 John Kerr, der einen der ersten wissenschaftlichen Artikel hierzu publizierte und das Wort Apoptose primär verwendete. Der Begriff der Apoptose stammt aus dem Griechischen von „apoptōsis“ und bedeutet so viel wie „der Abfall oder Niedergang“ (Kerr *et al.* 1972).

Der programmierte Zelltod ist ein für die Eliminierung von krankheitsbehafteten, entarteten oder nicht mehr benötigten Zellen elementarer Prozess. Er tritt zum Beispiel während der embryonalen Entwicklung auf (Wyllie *et al.* 1980). So können Zellen in den Fingerzwischenräumen, die für den Organismus keinen Nutzen mehr haben, durch Apoptose beseitigt werden (Abb. 4) (Alberts 2012, Weinberg 2014). Die vor allem in multizellulären Organismen auftretende Apoptose zeigt eine charakteristische Zellmorphologie, die sich durch Bläschenbildung an der äußeren Zellmembran, dem Schrumpfen der Zelle durch Dehydration, der Kondensation des Chromatins und der Fragmentierung des Zellkerns sowie der chromosomalen DNA manifestiert (Zhivotovsky 2004, Ziegler und Groscurth 2004).

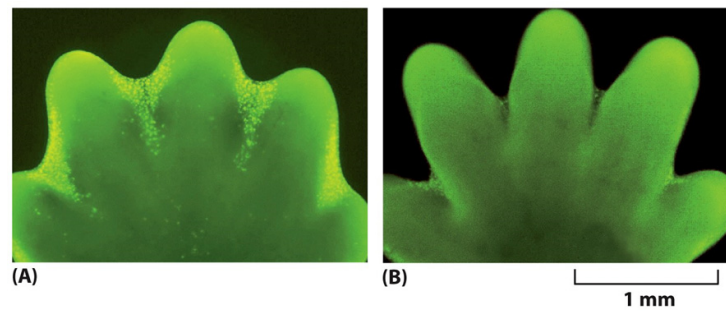


Abb. 4 – Apoptose in der embryonalen Entwicklung

In einer noch undifferenzierten Mauspfote sind die apoptotischen Zellen zunächst grün punktiert (A). Zu einem späteren Zeitpunkt ist das apoptotische Gewebe bereits nicht mehr vorhanden und die ausdifferenzierten Zehen der Pfote sind deutlich zu erkennen (B). (Alberts 2012)

Apoptose ist nicht die einzige Form des Zelltods, aber die bisher in ihrem Ablauf und den partizipierenden Proteinen am besten untersuchte Variante (Bratton und Salvesen 2010).

Eine weitere Variante stellt die sog. Nekrose dar, welche sich namentlich von dem Griechischen Wort „*nékrosis*“ ableitet und das Absterben einzelner Glieder und damit „das Töten“ einleitet (Proskuryakov *et al.* 2003). Im Vergleich zur Apoptose ist die Nekrose primär auf externe Einflüsse wie Traumata, Toxine oder Infektionen zurückzuführen, welche Zellen oder Gewebe schädigen. Nekrose tritt dabei nicht selektiv auf, was in der Konsequenz für den Organismus meist sehr schädlich ist und sogar zum Tode führen kann (Proskuryakov *et al.* 2003). Auch unterscheiden sich nekrotische und apoptotische Zellen in ihrem Phänotyp. Während die Apoptose nach einem spezifischen Muster abläuft, zeigt sich bei nekrotischen Zellen schnell der Verlust der Zellmembran mit unkontrollierter Ausschüttung des Zytoplasmas in den intrazellulären Raum. Dabei kann es dann zu Infektionen und Ausweitung der Nekrose auf umliegendes Gewebe kommen (Kasper 2001). Derartige Entzündungsreaktionen, werden durch die Apoptose vermieden, wodurch Zellen ohne zusätzliche Gewebeschäden entsorgt werden können (Kasper 2001). Ein Vergleich von Apoptose und Nekrose findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1 – Apoptose vs. Nekrose

Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose in einer direkten Gegenüberstellung.

	APOPTOSE	NEKROSE
MORPHOLOGIE		
Betroffene Zellen	Individuelle Zellen	Zellkollektive
Zellvolumen	Verringert	Vergrößert
Chromatin	Kondensiert	Fragmentiert
Mitochondrien	Normale Morphologie	Veränderte Morphologie
Entzündungsreaktion	Nein	Ja
Zellschicksal	Apoptotische Vesikel von Makrophagen aufgenommen	Lyse
MOLEKULARBIOLOGIE		
Genetische Aktivität	Benötigt	Nicht benötigt
Chromosomale DNA	Spezifisch geschnitten	Unspezifisch geschnitten
Intrazelluläres Kalzium	Erhöht	Nicht betroffen
Ionenpumpen	Funktionsfähig	Verloren

(Weinberg 2014)

Die Apoptose lässt sich in zwei Phasen unterteilen, die Initiations- und die Effektorphase. In ersterer wird zwischen zwei weiteren genau definierten Signalwegen unterschieden. Man spricht von einem extrinsischen (Apoptose Typl), und einem intrinsischen (Apoptose Typll) Signalweg, welche beide jeweils mit dem Tod der Zelle enden. Dabei werden über externe und interne Stimuli zelluläre Signalkaskaden aktiviert. Diese beinhalten die Aktivierung spezifischer degradierender Enzyme, der sog. Caspasen, welche die Spaltung unterschiedlicher zellinterner Substrate wie von Proteinen, DNA und Zytoskelettbestandteilen, einleiten und letztlich das kontrollierte Absterben der Zelle zum Ziel haben (Adams und Cory 2007).

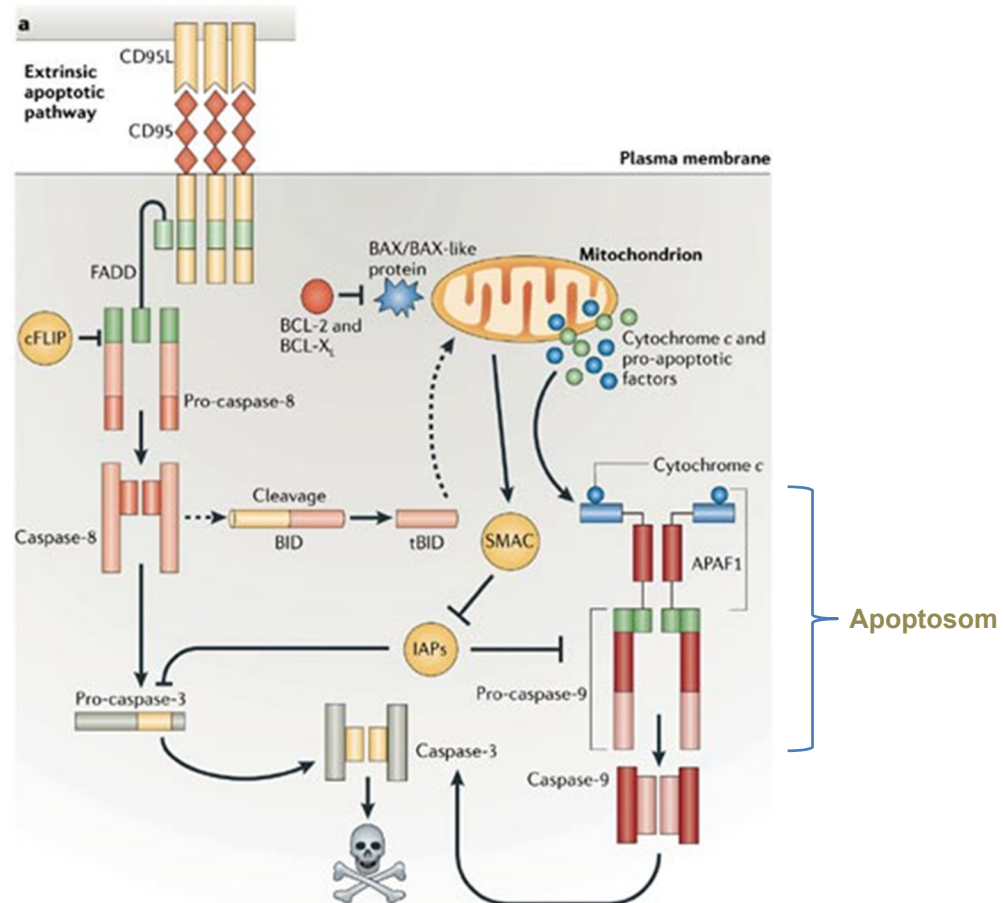


Abb. 5 – Schematische Darstellung der zellulären Apoptose-Signalwege

Die extrinsische Apoptose-Induktion wird über Transmembranrezeptoren (CD₉₅, Fas, TNFR) (hellorange/rot) vermittelt. Werden diese Rezeptoren aktiviert, kommt es zur Bildung des FADD-Komplex (hellorange/grün), wodurch Caspase-8 (hell-/dunkelrot) in ihren aktiven Zustand versetzt wird und somit Caspase-3 und -7 (grau/hellgelb) aktiviert, bzw. Bid (hellgelb/-rot) zu tBid (hellrot) spaltet. Die intrinsische Apoptose-Induktion wird über die Freisetzung von Cytochrom c (grün/blau) aus den Mitochondrien ins Zytoplasma induziert. Cytochrom c bildet dann zusammen mit Apaf-1 und der Pro-Caspase-9 das Apoptosom (dunkelblau/hell-/dunkelrot/ grün), wodurch Caspase-9 und schließlich die Effektor-Caspasen-3 und -7 aktiviert werden. Der apoptotische Prozess kann über die endogenen Apoptose-Inhibitor-Proteine (IAPs, dunkelgelb) antagonisiert werden, welche Caspasen über direkte Bindung zu inhibieren vermögen. Smac/DIABLO (dunkelgelb) wird ebenfalls während der Apoptose ins Zytoplasma ausgeschüttet und wirkt als Negativ-Regulator der IAPs. Ebenso ist eine Inhibition der Apoptose durch FLIP (dunkelgelb) möglich, welches Caspase-8 zu hemmen vermag. BAX, *Bcl2 associated X-Protein*; FADD, *FAS-associated death domain*; FLIP, *FLICE-inhibited Protein*; IAP, *Inhibitors of Apoptosis*; BID, *BH3 interacting domain death agonist*; tBID, *truncated BID*; Smac/DIABLO, *Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases/ Direct*

IAP-Binding Protein With Low PI. Weiter Erläuterungen siehe Text. (Hotchkiss und Nicholson 2006)

1.3.1 Extrinsischer Signalweg der Apoptose

Der extrinsische Signalweg leitet die Apoptose über transmembrane Oberflächenrezeptoren wie Fas (CD₉₅/ APO1) und TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) ein (Budd 2002, Kichev *et al.* 2014). Nachdem ein spezifischer Ligand (TNF- α) an Fas bindet, findet eine Trimerisierung bzw. Oligomerisierung des FAS-Rezeptors statt, wodurch die Bildung des DISC (*Death Inducing Signal Complex*), initiiert wird. Dieser besteht aus dem Fas-Adapterprotein FADD (*Fas Associated Death Domain*), der über seine DD-Domäne (*Death Domain*) intrazellulär an Fas bindet und über die DED-Domäne (*Death Effector Domain*) die apikalen Procaspasen-8 und -10 rekrutiert (Budd 2002, MacFarlane 2003). Bindet TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) an einen seiner Zielrezeptoren (DR₄, DR₅), findet eine Aktivierung der Caspasen-8 und -10 ebenfalls über DISC statt (Ndebele *et al.* 2008). Diese aktiven Caspasen induzieren wiederum die Spaltung der Pro-Caspasen-3, -6 und -7, die dann als Effektoren der Apoptose wirken, in dem sie in ihrer aktiven Form zelluläre Komponenten wie die Lamine der Kernmembran und Proteine des Zytoskeletts abbauen und die Degradation der DNA durch DNAsen ermöglichen (Rao *et al.* 1996, Hofmann *et al.* 1997, Kothakota *et al.* 1997). Zusätzlich kann Caspase-8 parallel das Bcl-2-(*B-cell lymphoma 2*) Homolog Bid (*BH3 interacting-domain death agonist*) zu tBid (*truncated Bid*) spalten, wodurch zeitgleich die mitochondriale/ intrinsische Apoptose induziert wird (Li *et al.* 1998).

1.3.2 Intrinsischer Signalweg der Apoptose

Der intrinsische Signalweg wird durch Stresssignale wie Hitze, virale Infektionen, Hypoxie oder eine zu hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration aktiviert (Mattson und Chan 2003). Im Mittelpunkt stehen hier die Mitochondrien, die als „Kraftwerke“ der Zelle essentiell für den Energiestoffwechsel des Organismus sind (Henze und Martin 2003). Tritt ein solches Stresssignal auf, kommt es an der äußeren mitochondrialen Membran zu einer Anlagerung von Homodimeren pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie (Bax, Bid, Bak, Bad) (Vinay Kumar 1998). Dadurch erhöht sich die Permeabilität der Membran und weitere pro-apoptotische Faktoren wie Smac/ DIABLO und Cytochrom c werden in das Zytoplasma freigesetzt (Fesik und Shi 2001). Die zugrundeliegenden Mechanismen, konnten bisher allerdings nicht im Detail geklärt werden. Man geht jedoch davon aus, dass es sich um einen speziellen Ionen-Kanal handelt (MAC: *Mitochondrial Apoptosis-Induced Channel*), der kurz vor Eintreten der Apoptose in der äußeren Membran der Mitochondrien gebildet wird (Dejean *et al.* 2006).

Ist Cytochrom c schließlich im Zytoplasma, verbindet es sich mit Apaf-1 und formt über seine CARD-Domäne (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) gemeinsam mit der aktivierten Caspase-9 in einem Verhältnis von 1:1:1 einen speziellen Multiproteinkomplex, das Apoptosom (Zou *et al.* 2003). Dieses spaltet und aktiviert dann die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 (Srinivasula *et al.* 1998). Sind letztere erst einmal aktiv, verläuft die Apoptose im Weiteren wie bereits unter 1.3.1 beschrieben.

1.4 Caspasen

Caspasen gehören zur Familie der Cysteinproteasen, welche eine wichtige Rolle in der Initialisierung und dem Prozess der Apoptose spielen, aber auch während der Nekrose- oder im Rahmen von Entzündungsreaktion auftreten (Alnemri *et al.* 1996). Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen) tragen an ihrem aktiven Zentrum ein Cystein-Rest und spalten ihr Substrat nahe der Aminosäure Aspartat (Fiandalo und Kyprianou 2012). Je nach Funktion im Ablauf der Apoptose werden sie in die Gruppe der Initiatoren (Caspase-2, -8, -9, -10) oder der Effektoren (Caspase-3, -6, -7) eingeteilt (Green 1998). Effektor-Caspasen liegen als Dimere vor und werden erst durch enzymatische Prozessierung aktiviert. Initiator-Caspasen hingegen werden als monomere Zymogene translatiert, deren Dimerisierung und somit aktive Form, erst durch formierte Proteinkomplexe wie dem beschriebenen Apoptosom oder DISC, induziert wird (Boatright *et al.* 2003, Olsson und Zhivotovsky 2011).

Zwar zeigen jüngste Studien, dass jede Caspase nach ihrer Aktivierung eine eigens definierte Funktion besitzt, dennoch sind diese bisher noch nicht in vollem Umfang untersucht (Brentnall *et al.* 2013). Caspase-8, wie auch die Caspasen-3, -7 und -9 stehen auf Grund ihrer zentralen Rolle im Mittelpunkt vieler Forschungsarbeiten. Caspase-8 ist beispielsweise nicht nur ein Teil der extern induzierten Apoptosekaskade, sondern als elementar für einen adäquaten Ablauf der Apoptose selbst anzusehen. In Abwesenheit von Caspase-8 sind die Zellen weniger anfällig für exogene „Todessignale“ (Krelin *et al.* 2008). In Tumorzellen findet sich daher häufig eine veränderte Regulation der Caspase-8 auf Transkriptionsebene oder sogar eine komplette Deletion des kodierenden Gens (Teitz *et al.* 2000). Caspase-9 ist essentiell für die mitochondriale Apoptose, hochspezifisch und spaltet nur eine geringe Anzahl an Proteinen. Darunter befinden sich u.a. die Pro-Caspasen-3 und -7 sowie das pro-apoptotische Bid. Durch die Spaltung von Bid zu tBid, entsteht eine positive Rückkopplung zwischen der Aktivierung von Caspase-9 und der Produktion von pro-apoptotischem ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Brentnall *et al.* 2013).

Caspase-3 und -7 sind als Haupteffektoren der Apoptose für den größten Teil der proteolytischen Mechanismen verantwortlich, welche die Fragmentierung der Zelle und damit den typischen Phänotyp auslösen, durch welchen die Apoptose ursprünglich identifiziert wurde

(Wyllie 2010). Im Gegensatz zu Caspase-7 wird Caspase-3 nicht nur durch Caspase-9, sondern auch durch Caspase-8 reaktiviert (Degterev *et al.* 2003). Dennoch sind sich beide Caspasen in ihrer Struktur sehr ähnlich und zeigen ebenfalls eine identische Substratspezifität (Kumar 2007). Zu den Substraten der Caspasen gehören neben Strukturproteinen auch Signal- und DNA-Reparaturmoleküle (Fischer *et al.* 2003). Das in DNA-Reparatur und Stabilität involvierte Enzym PARP-1 (*poly ADP-ribose polymerase*), war das erste identifizierte Substrat von Caspase-3 und -7 (Alenzi *et al.* 2010). Weitere Substrate sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2 – Zielproteine der Caspasen-Spaltung

Eine Auswahl wichtiger Substrate der Caspase-Spaltung, getrennt nach ihrer zellulären Funktion bzw. Lokalisation.

ZIELPROTEINE (SUBSTRATE VON CASPASEN)	
PROTEINE DES ZYTOSKELETTS	Actin, β -catenin, fodrin, gelsolin, gas2, keratin
NUKLEÄRE PROTEINE	Lamin, Rb, Sp1, I κ B- α , DNA-PK, PARP, Mdm2, Histon H1, Topoisomerase I und II
REGULATORISCHE PROTEINE	Procaspasen, Bcl-2, Bcl-xL, p28, Bap31, MEKK1, Huntington, XIAP, Livin

Tabelle modifiziert nach Quinn L. Deveraux 1999, Boaz Nachmias 2003

Da für die zelluläre Homöostase insbesondere das balancierte Gleichgewicht zwischen dem Zelltod und dem Zellüberleben essentiell ist, wird dieses von zahlreichen Proteinen auf einer Vielzahl von Ebenen kontrolliert und reguliert (Galbán *et al.* 2008, Vucic 2012). In diesem Kontrollsystem nimmt die Proteinfamilie der „*Inhibitors of Apoptosis*“ (IAPs) einen besonderen Platz ein (Vucic 2012).

1.5 Inhibitoren der Apoptose (IAPs)

Seitdem vor über 20 Jahren die ersten Apoptose-Inhibitoren der IAP-Familie in Baculoviren als deren Schutz vor zu schnellem Zelltod nach Virusinfektion, gefunden wurden, konnten bis heute weitere Mitglieder dieser Familie in Hefen, Fliegen und höheren Vertebraten beschrieben werden (Crook *et al.* 1993). Charakteristisch für alle IAPs sind spezielle Sequenzmotive, die BIR (*Baculoviral IAP Repeat*) Domänen. IAPs tragen im N-terminalen

Bereich mindestens eine und maximal drei dieser Domänen. BIR-Domänen bestehen aus ungefähr 70 Aminosäuren und beinhalten in ihrem hydrophoben Kern eine Zinkfinger-Domäne, welche durch ein Histidin und drei Cystein-Reste koordiniert wird (Andersen *et al.* 2004). Des Weiteren können die IAPs anhand der BIR-Domäne mit Proteasen wie zum Beispiel den Caspasen interagieren und diese so inhibieren (Eckelman *et al.* 2006).

Am C-Terminus der IAPs findet sich in der Regel meist eine CARD- (*Caspase-Associated Recruitment Domain*) und eine RING (*Really Interesting New Gene*)-Domäne. Die CARD-Domäne kann ebenfalls Caspasen binden und trägt zu deren Inhibition bei, dennoch ist bis heute eine genaue Funktion dieser Domäne in IAPs weiter unklar (Vaux und Silke 2005). Die RING-Domäne hingegen trägt nachgewiesenermaßen einen großen Teil zur anti-apoptotischen Wirkweise der IAPs bei, indem sie E2 Ubiquitin-konjugierte Enzyme binden und das Ubiquitin auf ein Zielsubstrat übertragen kann (Joazeiro *et al.* 1999, Lorick *et al.* 1999). Somit erfüllen IAPs eine Funktion als E3-Ligase und besitzen die Fähigkeit ihre direkten Substrate (z.B. Caspasen) zu ubiquitinylieren, damit diese dann im 26S Proteasom abgebaut werden (Jesenberger und Jentsch 2002). Durch ihre Affinität zur Bildung von Homodimeren und Heterodimeren mit den Caspasen-3, -7 und -9, sind die IAPs darüber hinaus in der Lage die mitochondriale und rezeptorvermittelte Apoptose zu inhibieren (Galbán *et al.* 2008). Bis heute konnten im Menschen über die oben beschriebenen strukturellen Eigenschaften acht verschiedene IAPs identifiziert werden (Abb. 6).

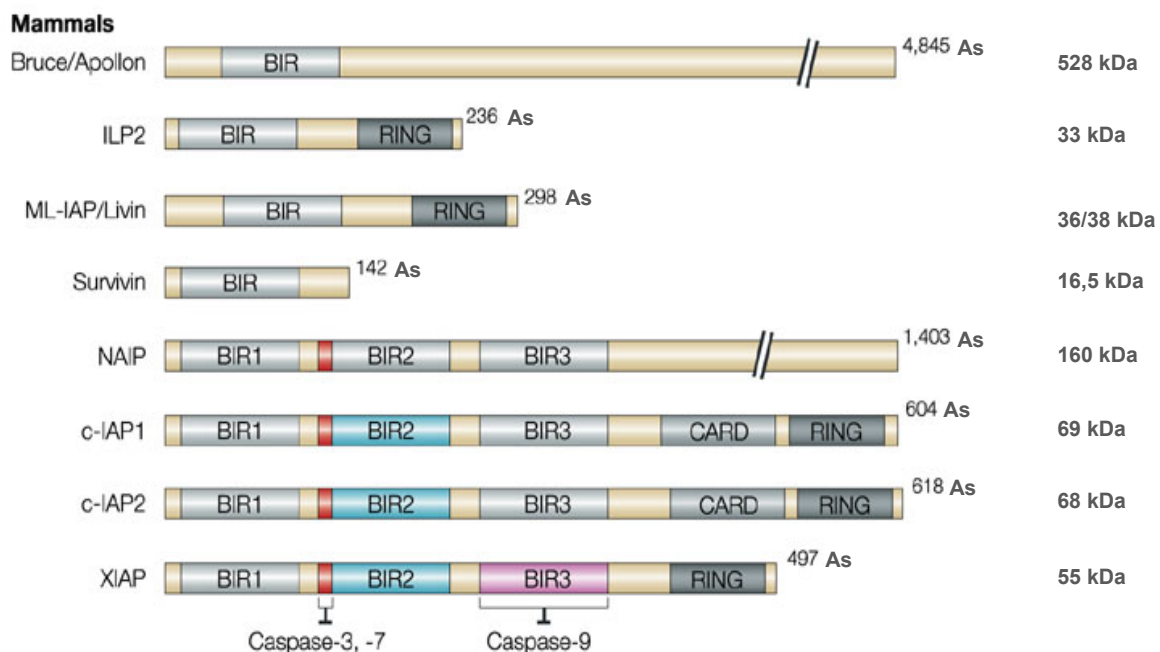


Abb. 6 – Schematische Darstellung der Inhibitoren der Apoptose-Proteinfamilie

Bis heute sind acht verschiedene Mitglieder der IAP-Familie im Menschen identifiziert worden. Sie sind grundsätzlich charakterisiert durch ihre N-terminalen BIR- (hellgrau, türkis, magenta) und C-terminalen RING-Domänen (dunkelgrau). Der rote Bereich markiert die Region zwischen der ersten und zweiten BIR-Domäne die zur Interaktion mit Caspase-3 und -7 wichtig ist. Einzig Survivin, das kleinste IAP, trägt keine RING-Domäne. Eine andere Besonderheit zeigen c-IAP1 und c-IAP2, da sie zur Caspase-Interaktion eine CARD (*Caspase-Recruiting*) - Domäne (dunkelgrau) besitzen. Angegeben sind zusätzlich die Anzahl der Aminosäuren (As) und das Molekulargewicht in kDa. Abbildung modifiziert nach (Riedl und Shi 2004).

1.5.1 Survivin

Survivin/BIRC5 ist ein Mitglied der IAP-Familie. Es wird während der embryonalen und fetalen Entwicklungsphase exprimiert und zeigt eine hohe Expression in vielen Tumorzellen (Tanaka *et al.* 2003, Stauber *et al.* 2007). Im Vergleich zu anderen IAPs zeigt Survivin einzigartige strukturelle Eigenschaften, durch welche es sich von den anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie abgrenzt. Bestehend aus 142 Aminosäuren und mit einem Molekulargewicht von 16,5 kDa ist Survivin das kleinste IAP (Altieri 2010). Neben der N-terminalen BIR-Domäne findet sich anstelle der sonst charakteristischen RING-Domäne eine lange α -Helix am C-Terminus (Abb. 7). Nach der Transkription können durch alternatives Spleißen zusätzlich zum Wildtyp, vier weitere Isoformen (2 α -Survivin (74 AS), 2B-Survivin (165 AS), Survivin Δ 3 (137 AS) und 3B-Survivin (120 AS)) mit ähnlicher oder auch völlig unterschiedlicher Funktion entstehen, welche ebenso diverse Einflüsse auf die Krebsentstehung haben können (Knauer *et al.* 2007, Vegran *et al.* 2011). Abgesehen davon, wird die biologische Funktion von Survivin weiterhin über posttranslationale Modifikationen reguliert, aber auch durch dessen Eigenschaft, zwischen dem Kern und dem Zytoplasma der Zelle durch passive Diffusion und aktiven Export, hin- und herwandern zu können (Knauer *et al.* 2007, Altieri 2010). Seine zwei wichtigsten Funktionen erfüllt Survivin als Apoptose-Inhibitor und während der Mitose als Teil des CPC (*Chromosomal Passenger Complex*), durch welchen der geregelte Ablauf der Zellteilung gewährleistet wird (Coumar *et al.* 2013). Ein intrinsisches, Leucin-reiches Exportsignal (NES) ermöglicht es Survivin entgegen eines Diffusionsgradienten aktiv aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert zu werden. Dieser Transport wird über die molekulare Interaktion mit dem Exportrezeptor Crm1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) vermittelt. Die Wechselwirkung zwischen Crm1 und Survivin ist jedoch nicht nur für den aktiven nukleären Export essentiell, sondern auch für die Lokalisation des CPC an die Centromere der Chromosomen, wodurch eine geregelte Mitose stattfinden kann.

Somit ist das vorhandene NES von enormer Bedeutung für beide Funktionen (Stauber *et al.* 2007).

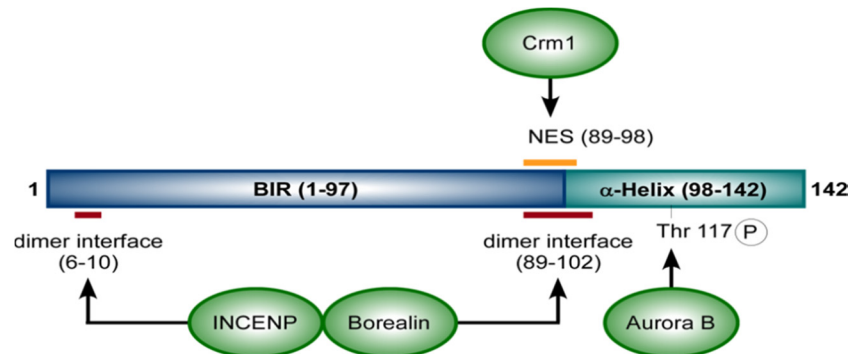


Abb. 7 – Schematische Darstellung der Domänenorganisation von Survivin

Survivin besitzt nur eine BIR-Domäne (dunkelblau) und eine C-terminale α-Helix (dunkelgrün). Survivin interagiert mit den CPC-Proteinen Aurora B, INCENP und Borealin (grün) über die dargestellten Aminosäurebereiche und gewährleistet so den korrekten Ablauf der Mitose, u.a. unter der Beteiligung einer Aurora B vermittelten Phosphorylierung von Survivin an Thr₁₁₇. Die Interaktion mit dem Transportrezeptor Crm1 (grün) wird über das intrinsische nukleäre Exportsignal (NES; gelb) vermittelt. Die Bereiche, welche die Homodimerisierung des Proteins vermitteln (rot), sind gleichzeitig essentiell für die Interaktion mit INCENP und Borealin. Aminosäure-Positionen sind in Klammern angegeben. Abbildung nach Elisabeth Schröder und Britta Unruhe.

Aufgrund der fehlenden RING-Domäne wurde viel über die anti-apoptotischen Eigenschaften von Survivin diskutiert und wie diese vermittelt werden könnten. So könnte Survivin die anderen Mitglieder der IAP-Familie in ihrer Funktion unterstützen, wie beispielsweise für die Interaktion von Survivin mit XIAP gezeigt. Über diese Interaktion ist Survivin in der Lage, dessen Ubiquitinylierung und proteasomalen Abbau zu verhindern (Dohi *et al.* 2004). Zudem kann Survivin mit dem XIAP-Inhibitor Smac/ DIABLO physisch interagieren und diesen so daran hindern den Caspase-9/ XIAP – Komplex zu lösen (Cheung *et al.* 2013).

1.5.2 XIAP

Ein weiteres Mitglied der IAP-Familie ist das primär zytoplasmatisch lokalisierte XIAP/BIRC 4 (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*). Mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, zählt XIAP zu den größeren Vertretern der Familie und gilt unter ihnen als eines der stärksten Negativ-Regulatoren des programmierten Zelltods. Im Vergleich zu gesunden Zellen ist seine Expression vergleichbar zu Survivin in Tumorzellen stark erhöht, was es so zu einem weiteren wichtigen Zielprotein in der Tumorbekämpfung macht (Kashkar 2010).

Über eine direkte Interaktion mit den Caspasen-3, -7 und -9, induziert es deren proteasomalen Abbau und kann so den intrinsischen wie auch den extrinsischen Apoptose-Weg maßgeblich beeinflussen (G.Korneluk 2001, Eckelman *et al.* 2006). Über die BIR-Domänen 1 und 2 bzw. die dazwischenliegende Region wird die Bindung an die Caspasen-3 und -7 vermittelt, wohingegen Caspase-9 an BIR3 bindet (Abb. 8) (Galbán und Duckett 2009). Allerdings kann XIAP als Resultat der Fas-induzierten Apoptose auch von den Caspasen-3 und -7 selbst gespalten werden und als Konsequenz einen Teil seiner anti-apoptotischen Funktion verlieren (Quinn L.Deveraux 1999).

Weiterhin ist belegt, dass XIAP nicht nur eine wichtige Position in der Regulation der Apoptose einnimmt, sondern auch an weiteren zellulären Signalkaskaden beteiligt ist. Dazu zählen die Aktivierung von NF- κ B und JNK (Sanna *et al.* 1998, Hofer-Warbinek *et al.* 2000), eine mögliche Funktion bei der angeborenen Immunabwehr (Bauler *et al.* 2008) sowie der Kupferhomöostase, Hypoxie und Mitose (van De Sluis *et al.* 2002, Mufti *et al.* 2006, van de Sluis *et al.* 2007). Jüngste Studien haben indes belegt, dass ein Funktionsverlust von XIAP sehr häufig bei Patienten gefunden wird, die eine X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung (XLP) aufweisen (Rigaud *et al.* 2006). Dies eröffnet neue Forschungsmöglichkeiten, um so ein detaillierteres Verständnis der physiologischen Funktionen von XIAP zu erlangen. XIAP scheint darüber hinaus, ebenso wie viele andere Proteine, in seiner intrinsischen biologischen Aktivität durch Dimerisierung, Phosphorylierung, proteolytischer Spaltung sowie subzelluläre Kompartimentierung, moduliert zu werden (Galbán und Duckett 2009). In diesem Zusammenhang ist die Interaktion von XIAP mit dem Tumorsuppressor XAF1 (*XIAP-Associated Factor 1*) zu nennen, welches an XIAP zu binden vermag. So soll dessen gegen die Caspasen gerichtete Aktivität verhindert und über die Komplexbildung (XIAP-XAF1) der proteasomale Abbau von Survivin gefördert werden (Arora *et al.* 2007).

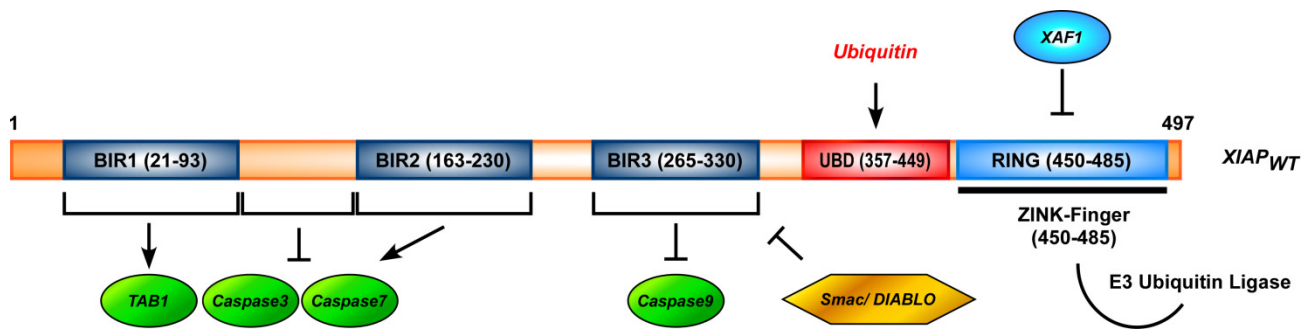


Abb. 8 – Schematische Darstellung der Domänenorganisation von XIAP

Über die BIR-Domänen (dunkelblau) kann XIAP die intrinsische und extrinsische Apoptose inhibieren. Über die direkte Interaktion mit den Caspasen-3, -7 und -9 (grün) wird deren proteasomaler Abbau über die E3-Ligase-Aktivität der RING-Domäne (hellblau) vermittelt. Dabei können pro-apoptotische Regulatoren wie XAF1 (türkis) und Smac/ DIABLO (gelb) ebenfalls über die BIR- bzw. RING-Domäne/ ZINK-Finger an XIAP binden und so dessen anti-apoptotische Wirkweise unterbinden. Ubiquitin kann über die UBA-Domäne (*Ubiquitin-Binding-Associated-Domain*) (rot) an XIAP binden. Für die Aktivierung von NF- κ B ist die Interaktion mit TAB1 (grün) über BIR1 ausschlaggebend. Aminosäure-Positionen sind in Klammern angegeben. Abbildung modifiziert nach Galbán und Duckett, 2009 sowie Tse 2012.

1.5.2.1 XAF1

XAF1 (*XIAP-Associated Factor 1*) ist ein 34 kDa großes Interferon (INF-) induzierbares Protein, welches in normalem Gewebe ubiquitär exprimiert wird, in Tumorzellen hingegen nur in sehr geringe Mengen vorkommt. Zunächst wurde XAF1 als wichtigster Interaktionspartner und Negativ-Regulator von XIAP identifiziert. Bindet XAF1 an XIAP, wird letzteres aus dem Zytoplasma in den Kern transloziert und dort eingelagert (Peter Liston und Tamai 2001). Weiterhin wird vermutet, dass XAF1 über eine C-terminale RBD-Domäne (*Ring Binding Domain*) auch die anderen Mitglieder der IAP-Familie zu binden und so die Apoptose voranzutreiben vermag (Tse *et al.* 2012, Zou *et al.* 2012). Da Survivin keine RING-Domäne besitzt, wurde bislang auch keine Interaktion mit XAF1 beschrieben.

Jüngst wurde belegt, dass Zellen, welche XAF1 verstärkt exprimieren, besonders sensitiv auf TNF- α reagieren und vergleichsweise schnell apoptotisch werden. Obwohl XAF1 als nukleäres Protein beschrieben wurde, findet es sich nach TNF- α Induktion an den Mitochondrien und initiiert sowohl die Ausschüttung von Cytochrom c ins Zytoplasma als auch die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax und leitet so XIAP-unabhängig die intrinsische Apoptose ein (Xia *et al.* 2006, Straszewski-Chavez *et al.* 2007). Somit scheinen

die pro-apoptotischen Funktionen von XAF1 weitreichender zu sein als bisher angenommen und es bedarf weiterer Untersuchungen, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen besser zu verstehen (Tse *et al.* 2012).

1.5.3 Livin

Als weiteres Mitglied der IAP-Familie nimmt Livin/ BIRC 7 eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose, der Zellproliferation und der Zellzykluskontrolle ein (Yan 2011). Livin wurde erstmalig in malignen Melanomen identifiziert und wird daher auch ML-IAP (Melanoma-IAP) genannt (Vucic *et al.* 2000, Franklin *et al.* 2003). Von Livin sind zwei Spleißvarianten bekannt: Livin- α (298 As/38 kDa) und Livin- β (280 As/36 kDa), welche jeweils nur eine N-terminale BIR- und eine C-terminale RING-Domäne tragen (Abb. 9) (Ashhab *et al.* 2001). Beide Isoformen werden im adulten Gewebe, besonders aber in Herz, Plazenta und Lunge exprimiert. Nur Livin- α findet sich in Lymphozyten, dem Gehirn und in Skelettmuskeln, wohingegen Livin- β auch in fötalem Gewebe exprimiert wird und für die Embryonalentwicklung von Bedeutung ist (Gazzaniga *et al.* 2003). Obwohl für viele Tumorarten (Darmkrebs, Leukämie, Blutkrebs, Hautkrebs) eine vermehrte Livin-Expression beschrieben wurde, ist nur die α -Form in einigen Melanom- und Lymphom-Zelllinien zu detektieren (Yagihashi *et al.* 2005).

Wie auch XIAP interagiert Livin mit den Caspasen-3, -7 und -9 und verhindert damit deren proapoptotische Wirkweise. Des Weiteren kann Livin Smac/DIABLO binden und so davon abhalten andere IAPs zu inhibieren (Ma *et al.* 2006). Die Wechselwirkung zwischen Livin und Smac/DIABLO ist allerdings von einer negativen Rückkopplung geprägt. Smac/DIABLO wird nämlich nicht nur von Livin inhibiert, sondern wirkt auch als Gegenspieler von Livin und fördert dessen Degradation (Vucic *et al.* 2002). Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden IAPs besteht darin, dass Livin wie auch XIAP von den Effektor-Caspasen -3 und -7 proteolytisch gespalten werden kann. Dabei entsteht eine große C-terminale Untereinheit (*tLivin_{long}*), welche weiterhin die komplette BIR- und RING-Domäne trägt und nicht nur ihre anti-apoptotische Funktion verliert, sondern im Gegenteil pro-apoptotisch wirken kann (Boaz Nachmias 2003). In *in vivo*-Experimenten konnte die Spaltung von Livin durch natürlichen Killerzellen (NK) und damit ein vermindertes Tumorstadium induziert werden. Da Livin nicht nur anti- sondern auch pro-apoptotische Funktionen erfüllt, wird in diesem Zusammenhang mehr von einem Apoptose-Regulator und nicht nur einem Inhibitor gesprochen (Abd-Elrahman *et al.* 2009).

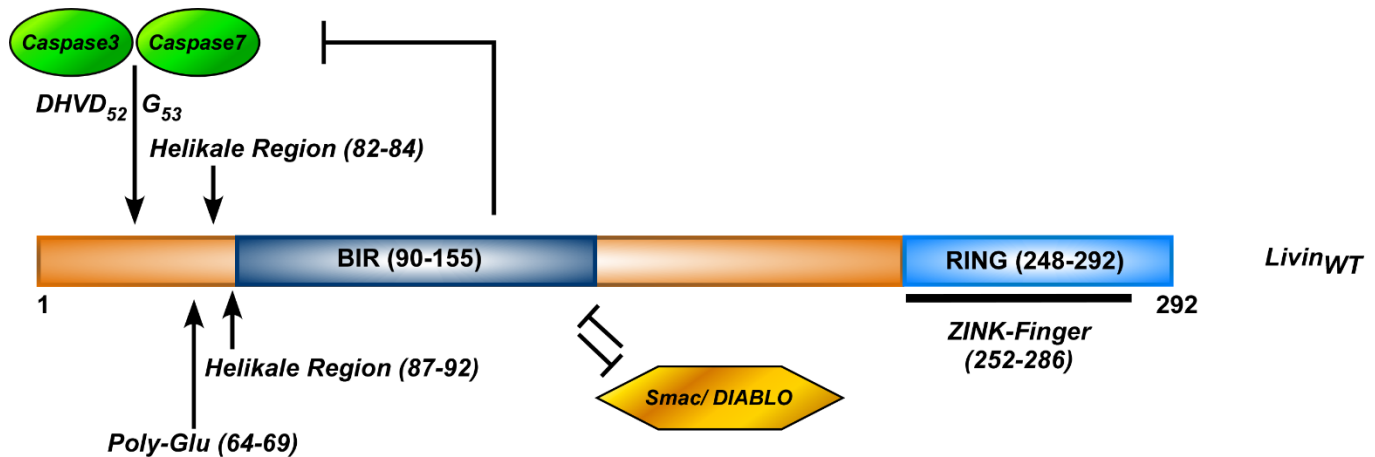


Abb. 9 – Schematische Darstellung der Domänenorganisation von Livin

Livin besitzt eine N-terminale BIR- (dunkelblau) und eine C-terminale RING-Domäne (hellblau)/ ZINK-Finger (schwarzer Strich) mit E3-Ligase Aktivität. Die BIR-Domäne vermittelt die direkte Interaktion mit den Caspasen-3, -7 (grün) sowie mit Smac/ DIABLO (gelb) und inhibiert somit deren pro-apoptotischen Funktionen. Im N-terminalen Bereich befindet sich neben zwei helikalen Bereichen und einer Glutamin-reichen Region (Poly-Glu) auch die Spaltstelle für die Caspasen-3 und -7 (Motiv: DHVD/G). Aminosäure-Positionen sind in Klammern bzw. tiefgestellt angegeben. Abbildung modifiziert nach (Boaz Nachmias 2003).

1.6 Nukleo-Zytoplasmatischer Transport

Eine entscheidende Eigenschaft eukaryontischer Zellen ist deren Trennung in Nukleus und Zytoplasma, welche durch die Kernhülle aufrechterhalten wird. Diese ist ein Doppelmembran-System mit einer hoch-selektiven Durchlässigkeit für verschiedenste Moleküle. Der Materialaustausch zwischen diesen beiden Kompartimenten findet nur an dafür vorgesehenen, die Kernmembran durchziehenden Transportkanälen, den Kernporenkomplexen (NPC: *Nuclear Pore Complexes*), statt (Ferrando-May 2005). Der NPC besteht grob aus drei Substrukturen, den zytoplasmatischen Fibrillen, dem zentralen Gerüst und dem nukleären Korb. Das zentrale Gerüst besteht aus beinahe 30 unterschiedlichen Proteinen, den sogenannten Nukleoporinen (NUPs). Ein Drittel dieser NUPs zeigt eine ungefaltete Struktur und besteht aus zahlreichen Phenylalanin-Glycin (FG) reichen Domänen (Cronshaw *et al.* 2002, Strawn *et al.* 2004). Es finden sich bis zu 50 FG-Wiederholungen im NPC, welche durch hydrophile Aminosäuresequenzen voneinander getrennt sind (Denning und Rexach 2007) (Abb. 10). So wird von den NUPs eine Permeabilitätsbarriere aufgestellt, welche den Transport von spezifischen Proteinen durch die Kernpore vermittelt, den Eintritt/ Austritt unspezifischer Proteine allerdings verhindert. Der Aufbau und der genaue

Wirkmechanismus dieser Barriere sind noch immer Gegenstand zahlreicher Forschungsbemühungen (Strambio-De-Castillia *et al.* 2010).

In einem der derzeit prominentesten Modelle, wird von einer hydrophoben Interaktion der FG-NUPs untereinander ausgegangen, wodurch sich aus diesen ein dreidimensionales Netzwerk ausbildet, ähnlich einem molekularen Sieb (Frey und Gorlich 2009). Dieses sog. Hydrogel verhindert den Durchtritt von Makromolekülen, deren Größe die „Maschenweite“ übertrifft. Eine Passage großer Moleküle ist daher nur möglich, wenn die Vernetzung des Gels kurzzeitig aufgebrochen wird. Hierzu müssen die zu transportierenden Proteine zunächst an entsprechende Transportrezeptoren binden. Diese sind wiederum in der Lage die schwachen hydrophoben Wechselwirkungen der NUPs untereinander zu lösen und somit den Durchtritt der Transportkomplexe zu ermöglichen (D'Angelo und Hetzer 2008).

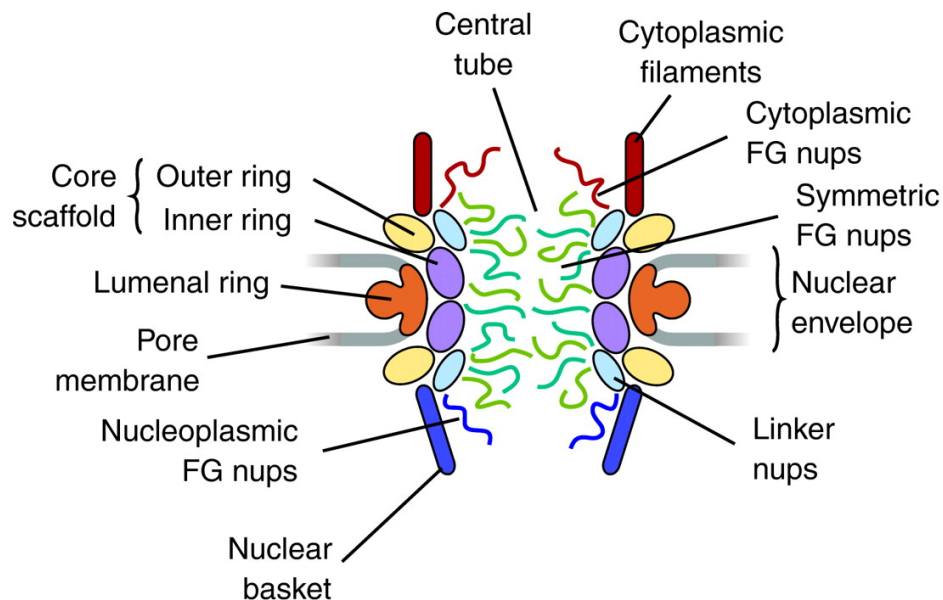


Abb. 10 – Schematische Darstellung eines Kernporenkomplexes

Der Kernporenkomplex durchzieht die Kernmembran und kann grob in drei Kompartimente unterteilt werden: Die zytoplasmatischen Fibrillen (rot), das zentrale Geflecht, bestehend aus dem inneren (violett), äußeren (gelb) und lumenalen (orange) Ring und dem nukleären Korb (blau). Innerhalb der Pore finden sich bis zu 30 unterschiedliche Proteine, sog. Nukleoporine (NUPs), welche für die selektive Permeabilität verantwortlich sind. (Wente und Rout 2010).

Kleine Moleküle, die eine Größe von 20 kDa nicht überschreiten, können passiv durch das FG-Netzwerk des NPC diffundieren. Abhängig von der Oberflächenstruktur der zu transportierenden Fracht können auch Makromoleküle bis zu einer Größe von ungefähr 60 kDa, den NPC passiv durchqueren (Wang und Brattain 2007). Ansonsten werden für den aktiven Transport größerer Moleküle spezifische Signale benötigt. Der aktive Transport ist jedoch effektiver und im Gegensatz zu passiven Diffusionsprozessen regulierbar. Bei den entsprechenden Signalen handelt es sich um definierte intrinsische Proteinsequenzen, welche entweder den Kernimport (NLS: *Nuclear Localization Signal*) oder den Kernexport (NES: *Nuclear Export Signal*) vermitteln. Über diese spezifischen Sequenzbereiche können die Frachtmoleküle dann von in Lösung befindlichen und je nach ihrer Funktion als Importine, Exportine oder Transportine bezeichneten Adapterproteine, erkannt und durch transiente Interaktion mit den FG-Nups durch die NPCs der Kernmembran transportiert werden (Stewart 2007, Lim *et al.* 2008).

Die Transportrezeptoren gehören zur Superfamilie der β -Karyopherine, welche durch eine N-terminale Ran-GTP Bindedomäne charakterisiert sind. Aktuell sind 20 β -Karyopherine im Menschen bekannt, von denen Importin- β zu den am besten untersuchten Vertretern zählt (Bischoff und Gorlich 1997). Hinsichtlich des klassischen Importwegs benötigen Proteine ein NLS, welches zunächst mit Importin- α als Adapter gebunden wird und dann über seine IBB-Domäne (*Importin- β Binding Domain*) mit Importin- β interagiert. Dieser Importin- α - β /NLS Komplex wird anschließend durch die Interaktion der FG-Nups mit Importin- β durch die Kernpore transportiert (Patel *et al.* 2007). Ebenso existieren Beispiele von Importin- β unabhängigem Import, indem Importin- α dann nicht als Adapter sondern selbst als Transportrezeptor fungiert (Miyamoto *et al.* 2002, Kotera *et al.* 2005). Als Quelle der benötigten chemischen Transportenergie und Richtungsweiser des aktiven Transports fungiert die kleine GTPase Ran, welche entweder GTP- oder GDP- gebunden vorliegen kann. In der Zelle wird über die distinkte subzelluläre Lokalisation der hierfür verantwortlichen Faktoren ein Ran-Gradient aufgebaut, welcher schließlich die Direktionalität des Transports steuert. Die Anwesenheit von RanGEF (*Ran Guanine Nucleotid Exchange Factor*) führt über den Austausch von GDP zu GTP zu einer hohen Konzentration von RanGTP im Zellkern wohingegen im Zytoplasma RanGAP (*GTPase-Activating Protein*) unter Beteiligung von RanBP1/2 (*Ran binding protein 1/2*) GTP zu GDP hydrolysiert (Matunis *et al.* 1998). Nach Import des im Zytoplasma in Anwesenheit von so gebildetem RanGTP formierten Rezeptor-Kargo-Komplexes (Kargo: Transportsubstrat), dissoziiert dieser im Kern in Anwesenheit von RanGTP. Andererseits wird RanGTP im Kern zur Ausbildung der Exportkomplexe und deren Transport über den NPC zu vermitteln benötigt (Richards *et al.* 1997) (Abb. 11). Die GTPase selbst ist ebenfalls in der Lage, in der Zelle zu wandern: RanGDP kann über den nukleären Transportfaktor 2 (NTF2) in den Zellkern reimportiert und dort schließlich durch RanGEF zu

RanGTP konvertiert werden. RanGTP vermittelt zudem über die Bindung des sog. CAS (*Cellular Apoptosis Susceptibility*)-Rezeptors die Dissoziation der Importkomplexe sowie den Export der Importine ins Zytoplasma der Zelle.

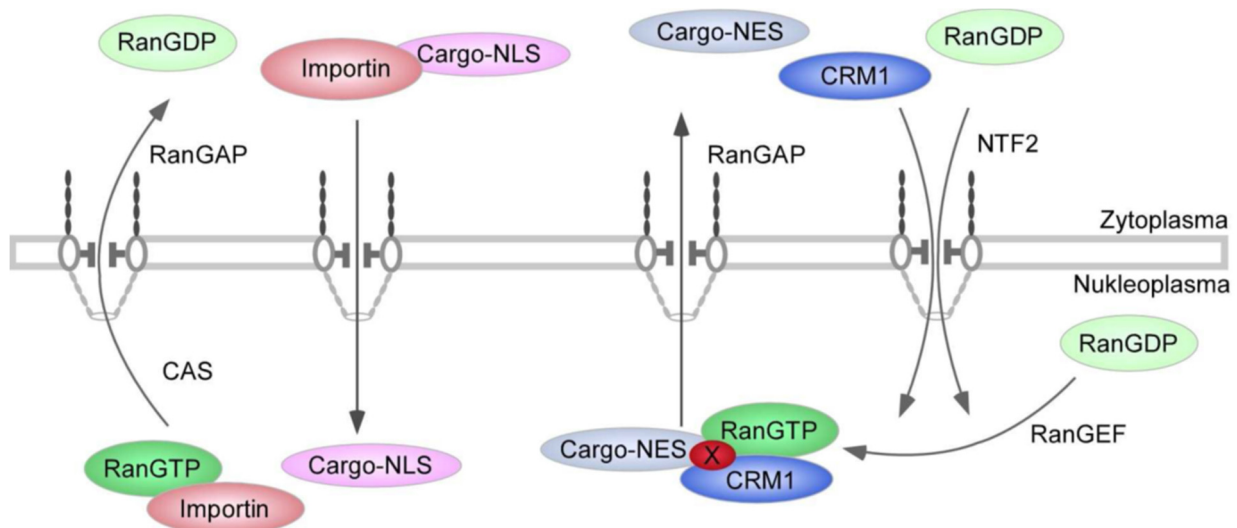


Abb. 11 – Schematische Darstellung des nukleo-zytoplasmatischen Transport-Zyklus

Nukleärer Import findet über die Importrezeptoren Importin- α / - β statt (rosa), welche das NLS am zu transportierenden Protein (violett) in Anwesenheit von RanGTP (dunkelgrün) im Zytoplasma erkennen. Der Importin-NLS-Protein-Komplex transloziert in den Kern, wo er in Anwesenheit von RanGTP über die Bindung des Export-Rezeptors CAS zerfällt und die Importine so zurück ins Zytoplasma transportiert werden. RanGAP hydrolysiert im Zytoplasma RanGTP zu RanGDP (hellgrün) und induziert so die Auflösung des Importin-CAS-Komplexes. Im Zellkern vermittelt RanGEF den Austausch von Ran-gebundenem GDP zu GTP, wodurch NES-tragende Proteine (hellgrau) an den nukleären Export-Rezeptor Exportin1/Crm1 (dunkelblau) binden können. Eine Hemmung dieser Interaktion durch chemische Inhibitoren (rot) führt daher zu einer Blockade des Exports. Nach dem Transport des Komplexes ins Zytoplasma dissoziiert der Komplex dort nach Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP und Exportin1/Crm1 gelangt über direkte Interaktion mit den Nukleoporinen zurück in den Zellkern. RanGDP wird durch NTF2 zurück in den Nukleus transportiert und wiederum über RanGEF zu RanGTP konvertiert (Fetz *et al.* 2009). Weitere Erläuterungen und Abkürzungen siehe Text.

1.6.1 Kernexport/ Crm1

Durch die räumliche Trennung von Kern und Zytoplasma muss, an der Kernmembran ein stetiger Austausch an Molekülen stattfinden, die im jeweiligen Kompartiment benötigt werden. Ob die Moleküle dabei passiv durch die NPCs diffundieren oder aktiv transportiert werden, hängt wie bereits erwähnt von der Größe sowie der Oberflächenbeschaffenheit des jeweiligen Moleküls/ Proteins ab (s. Kap. 1.6) (Güttler und Görlich 2011).

Wie ebenfalls im Vorfeld angedeutet, wird der aktive Transport zwischen Zytoplasma und Zellkern, durch Proteine der Karyopherin- β -Familie vermittelt. Von denen bis heute acht in höheren Eukaryonten, spezifisch für den Export, identifiziert werden konnten. Namentlich werden sie nach der Richtung des von Ihnen vermittelten Transports als Exportine oder Transportine bezeichnet (Tab. 3). Weiterhin werden Exportine nach ihren mehr oder minder spezifischen Substraten unterschieden. CAS/Exportin 2 ist beispielsweise höchst selektiv für den retrograden Export von Importin- α und führt es zurück ins Zytoplasma. (Kutay *et al.* 1997). Crm1/ Exportin 1 bindet dagegen eine äußerst diverse Anzahl an Substraten. Deren Erkennungs-Sequenzen, die nukleären Exportsignale (NES) setzen sich meist aus etwa 10 Aminosäuren zusammen, welche zum Großteil hydrophobe Seitenketten aufweisen, also reich an den Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Methionin oder Phenylalanin sind. Derartige Leucin-reiche NES wurden bereits in unzähligen zellulären und viralen Proteinen nachgewiesen und erfüllen weitreichende biologische Funktionen, wie die Kontrolle des Zellzyklus, der Transkription und des RNA-Transports (Knauer *et al.* 2005).

Frühe Studien konnten Leucin-Reste im C-terminalen Bereich der entsprechenden Sequenz als für deren Funktionalität essentiellen Bestandteil identifizieren (Wen *et al.* 1995, la Cour *et al.* 2003). Detailliertere Analysen führten zur Festlegung einer Konsensus-Sequenz für Leucin-reiche NES, durch welche generell der Großteil Helix-enthaltender Proteine beschrieben werden kann (Dong *et al.* 2009): $\Phi^1 - X_{(2-3)} - \Phi^2 - X_{(2-3)} - \Phi^3 - X - \Phi^4$ ($\Phi = K, V, I, F, M$; $X_{(n)}$ = jede As, n = Anzahl der AS) (Bogerd *et al.* 1996, Fornerod und Ohno 2002, la Cour *et al.* 2004).

Um im Zytoplasma eine Bindung zwischen Ran-freiem Crm1 und diversen NES-tragenden Proteinen zu verhindern, zeigen die Signale Crm1 gegenüber eine geringe Affinität. Die spezifischeren Transportrezeptoren CAS und Exp-t binden im Vergleich hierzu wesentlich stärker an die zu transportierenden Proteine (Kutay *et al.* 1998, Güttler *et al.* 2010). Aktuelle Strukturdaten belegen, dass verschiedene Leucin-reiche NES über ihre α -helikale oder Helix ähnlicher Struktur fünf Φ -Bindestellen in der hydrophoben Tasche von Crm1 belegen und erweitern damit die strukturelle Komplexität der Konsensussequenz, und ergibt für das PKI-NES: $\Phi^0 - X_2 - \Phi^1 - X_3 - \Phi^2 - X_2 - \Phi^3 - X - \Phi^4$ und für das RevNES: $\Phi^0 \Phi^{1PRO} - X - \Phi^2 - X_2 - \Phi^3 - X - \Phi^4$ ($\Phi = K, V, I, F, M$; X_n = jede As, n = Anzahl der AS). Prolin kann u.a. selbst als Φ^1 dienen und fügt sich generell nicht in α -helikale Konformationen ein. Eine NES-Erkennung durch den Rezeptor

kann allerdings auch bei einer Abweichung von der beschriebenen Konsensus-Sequenz erfolgen. Dabei gilt: 1. solange die Φ -Positionen generell optimal besetzt sind, kann auf einzelne Φ verzichtet werden, 2. Die Interaktion mit Crm1 toleriert unterschiedlich hydrophobe Aminosäuren an den Φ -Bindestellen und 3. können sich zwischen der zweiten und dritten Φ -Bindestelle auch zwei oder drei Aminosäuren befinden (Güttler *et al.* 2010).

Tabelle 3 – Exportrezeptoren in höheren Eukaryonten

In höheren Eukaryonten konnten bislang acht verschiedene Exportine identifiziert werden. Diese zeigen unterschiedliche Präferenzen in der Interaktion mit ihren jeweiligen Transportsubstraten. Die Wechselwirkung zwischen Crm1 und einigen Substraten wird über Adaptermoleküle bewerkstelligt, da Crm1 diese nicht direkt binden kann. Zudem zeigen manche Transportrezeptoren auch eine bidirektionale Funktion und werden demnach auch als Transportine bezeichnet.

TRANSPORTREZEPTOR	SUBSTRAT	ADAPTER
Crm1/ Exportin 1	- Leucin-reiche NES - HIV1 genomische RNA - 60S pre-ribosomale UE - Snurportin 1	HIV1 Rev NMD3
CAS/ Exportin 2	Importin α	
Exp-t/ Xpot	tRNA	
Exportin5/ Xpo5	- tRNA - dsRNA Bindeproteine - pre-miRNAs	
Exportin 6	Actin-Profilin Komplexe	
Exportin 7	- P50RhoGAP - 14-3-3 σ	
Transportine		
Importin 13	<i>Import:</i> Mago-Y14 <i>Export:</i> eIF1A	
Exportin 4	<i>Import:</i> Sox2, SRY <i>Export:</i> eIF5A, Smad3	

NES: Nukleäres Export Signal; HIV, Humanes Immundefizienzvirus; RNA, Ribonukleinsäure; UE, Untereinheit; tRNA; transfer-RNA; dsRNA, doppelsträngige RNA; miRNA, mikro-RNA; Sox2, SRY (*Sex Determining Region Y*)-Box 2; Smad3, *Mothers against decapentaplegic*

homolog 3. Crm1, Chromosome region maintenance 1; CAS, Cellular Apoptosis Susceptibility.
Tabelle modifiziert nach Güttler und Görlich, 2011.

Neben der Bindestelle für die Exportsignale besitzt Crm1 an seinem C-Terminus ein Ran-Binde-Element, über welches die Interaktion mit RanGTP ermöglicht wird. Nach der Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung im Exportin, wodurch die Substrat-Bindestelle aktiviert wird (Güttler und Görlich 2011). Der RanGTP-Crm1-Substrat Komplex wird dann von nukleären FG-Nups erkannt und ins Zytoplasma transportiert. Dort findet über Nup214 und RanGAP1 unter Beteiligung von RanBP1/2 die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP statt, wodurch der Transportkomplex dissoziiert und das Substrat ins Zytoplasma entlassen wird (Güttler und Görlich 2011, Wu *et al.* 2013).

1.6.2 Crm1-Inhibitoren

Ein wichtiges Werkzeug zur Analyse von Exportsignalen ist das natürlich vorkommende 0,54 kDa große Polyketid Leptomycin B (LMB) (*Schizosaccharomyces pombe*), welches ein effizienter, hoch selektiver und irreversibler Inhibitor von Crm1 ist. LMB hat ein Molekulargewicht von 540,7 g/mol und besteht aus einer ungesättigten, verzweigten Fettsäurekette inklusive einem terminalen Lakton-Ring. Indem es an Cys₅₂₈ in der Bindefurche für NES bindet (Abb. 12), kann Crm1 keine weitere NES-Interaktion eingehen (Kudo *et al.* 1999). Weiterhin unklar ist allerdings, ob LMB als NES-Nachahmer fungiert oder die Konformation von Crm1 im Ganzen verändert (Sun *et al.* 2013).

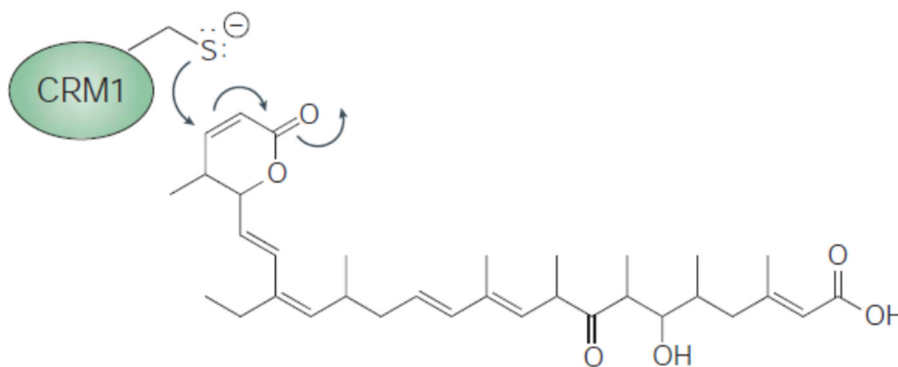


Abb. 12 – Michaelis-Addition von LMB an das Cystein₅₂₈ von Crm1

Struktur von Leptomycin B und schematische Darstellung der Michaelis-Addition an das Cystein₅₂₈ von Crm1 (Kau *et al.* 2004). Weitere Erläuterungen siehe Text.

Ein ebenso potenter Inhibitor von Crm1 ist das Antibiotikum Ratjadon A (Rat A, 456,6 g/mol), das aus dem bodenlebenden Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert werden konnte (Gerth *et al.* 1995). Neben Rat A, sind noch drei weitere Mitglieder der Familie der Ratjadone bekannt (Rat B/ C/ D), welche ebenfalls in der Lage sind den Crm1 vermittelten Export über die Bindung an Cys₅₂₈ zu inhibieren. Inwieweit dies auch über einen dem LMB vergleichbaren irreversiblen Mechanismus vermittelt wird, ist bisher nicht genau verstanden (Kalesse *et al.* 2001, Koster *et al.* 2003, Meissner *et al.* 2004). So konnte zudem für Callystatin A (Kobayashi 1997) aus *Callyspongia truncata*, Kazusamycin A und B (Wolff *et al.* 1997), aus *Streptomyces sp.* sowie Anguinomycin C aus *Streptomyces sp.* (Bonazzi *et al.* 2007), 1'S-1'-acetoxychavicol acetate (ACA) aus *Alpinia galanga* (Ye und Li 2006) und Valtrat aus *Valerianae Radix* (Murakami *et al.* 2002), eine inhibitorische Wirkung auf Crm1 nachgewiesen werden (Abb. 13).

Naturstoffe

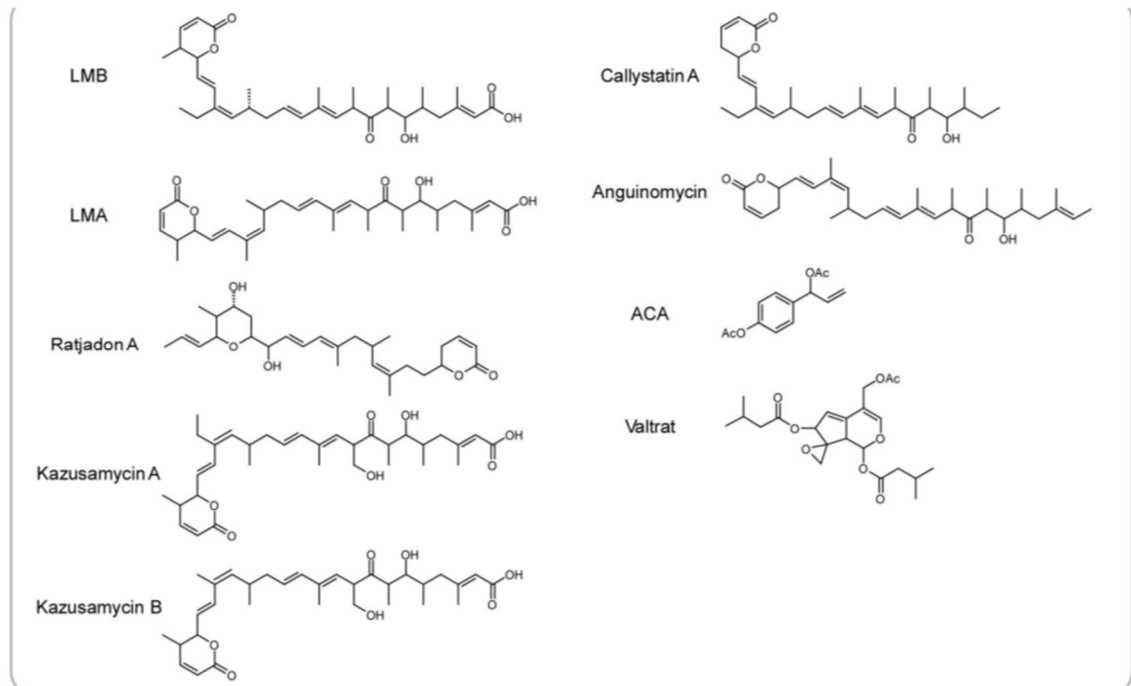


Abb. 13 – Natürliche vorkommende Export-Inhibitoren

Bislang konnte eine Reihe natürlich vorkommender und teils strukturell ähnlicher Inhibitoren des zellulären Kernexports aus unterschiedlichen Spezies identifiziert werden, welche gezielt den Exportrezeptor Crm1 hemmen. Weitere Erläuterungen und Abkürzungen siehe Text.

1.7 Zielsetzung

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist ein hochspezifisches und streng reguliertes Kontrollsystem, welches in der Entwicklung des Organismus eine entscheidende Rolle einnimmt und ihn zeitgleich als natürliche Barriere vor der Entstehung von Krebs schützen soll. Apoptose kann über zwei Signalwege initiiert werden, dem extrinsischen, rezeptorvermittelten und dem intrinsischen, mitochondrialen Signalweg. Die Hauptakteure in beiden Signalkaskaden sind die pro-apoptotischen Caspasen und die anti-apoptotischen IAPs, die während der Apoptose in einem empfindlichen Gleichgewicht stehen. Da eine Fehlregulation der hier beteiligten Proteine auch die Entstehung von Krebs begünstigen kann, ist es von großer Bedeutung, deren Funktionsweise ins Detail zu verstehen. Im Vergleich zu gesundem Gewebe findet sich in einer Vielzahl von Tumoren eine signifikant erhöhte Expression der Apoptose-Inhibitoren (IAPs), was diese speziell in den Fokus der aktuellen Tumorforschung stellt.

Trotz der Vielzahl an Studien, welche sich in den vergangenen Jahren nicht nur vornehmlich mit Survivin, sondern auch dem Apoptoseinhibitor XIAP beschäftigten, nimmt Survivin noch immer eine Sonderrolle innerhalb der IAP-Familie ein. Es besitzt ein nukleäres Exportsignal (NES), welches seine Interaktion mit dem Exportrezeptor Crm1 ermöglicht und für seine Funktion als anti-apoptotisches Protein wie auch für seine Rolle als Mitose-Regulator im *Chromosomal Passenger Complex* (CPC) essentiell ist.

Aktuelle Ergebnisse zeigten, dass XIAP nach Überexpression anteilig und nach Kotransfektion mit dem XIAP-Inhibitor XAF1 oder nach Behandlung mit dem Exportinhibitor LMB komplett im Zellkern lokalisiert. Da die anti-apoptotische Wirkung von XIAP von der Interaktion mit den Caspasen im Zytoplasma abhängt, sollte im ersten Teil dieser Arbeit analysiert werden, auf welchem Weg XIAP aus dem Kern zurück ins Zytoplasma gelangen kann und ob dies auf das Vorhandensein eines bisher nicht identifizierten Exportsignals zurückzuführen ist.

Da Survivin zudem als direkter Interaktionspartner von XIAP diskutiert wird und dessen proteolytischen Abbau verhindern kann, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit am Beispiel von Livin mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Analysen ein möglicher Einfluss von Survivin auf andere Mitglieder der IAP-Familie exemplarisch untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die eingesetzten DNA- und Protein Größenstandards stammten von MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Zellkulturmaterialien wurden von Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickenhäusen) oder Peqlab (Erlangen) erworben. Für die Fluoreszenzmikroskopie verwendete 3,5cm Schälchen wurden von der Firma MatTek (Ashland, MA, USA) bezogen. Die am konfokalen Mikroskop verwendeten μ -Slide 8-Loch-Kammern stammten von der Firma ibidi GmbH (München).

2.1.2 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle Tab. aufgeführt.

Tab. 4: Verwendete Kits

Kit	Verwendungszweck	Hersteller
DNA Ligation Kit Ver2.1	Ligation von DNA-Enden	Mobitec, (Göttingen)
Nucleo Bond Xtra Midi	Isolation von Plasmiden aus einer 200 ml Bakterienkultur	Macherey-Nagel
Nucleo Spin Multi-8-Plasmid	Isolation von Plasmiden aus einer 5 ml Bakterienkultur	Macherey-Nagel
Nucleo Spin Extract II	Aufreinigung von DNA (PCR/Agarosegel)	Macherey-Nagel
μ MACS c-myc Isolation Kit	Isolation von c-Myc Fusionsproteinen	Miltenyi Biotec
μ MACS GFP Isolation Kit	Isolation von GFP Fusionsproteinen	Miltenyi Biotec
TNT T7 Quick Master Mix	<i>In vitro</i> -Translation	Promega (Madison, USA)

2.1.3 Puffer und Lösungen

PBS	10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4
TBS	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl
TBST	TBS + 0,1 % Tween 20

Alle weiteren Puffer und Lösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Methodenteil mit aufgeführt.

2.1.4 Antibiotika

Antibiotika für Bakterien wurden steril filtriert und in den unten aufgeführten Konzentrationen dem Kultivierungsmedium zugesetzt.

Tab. 5: Antibiotika für Bakterien

Antibiotikum	eingesetzte Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Carbenicillin	100µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

2.1.5 Antikörper

Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Tab. 6: Primärantikörper

Antigen	Ursprung	Verdünnung		Hersteller
		WB	IF	
Aktin	Ziege	1:1000	-	Santa-Cruz
Caspase 3	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signaling
Crm1	Kaninchen	1:5000	-	Novus Biologicals
GAPDH	Maus	1:1000	-	Santa-Cruz
GFP	Kaninchen	1:5000	-	Santa-Cruz
HA	Maus	1:1000	-	Covance
Flag	Maus	1:2000	-	Sigma
Livin	Maus	1:1000	-	GeneTex
Livin	Kaninchen	1:1000	1:200	Cell Signaling
Lamin	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signaling
Myc	Maus	-	1:2000	Cell Signaling
Survivin	Maus	1:1000	1:100	Novus Biologicals
Survivin	Kaninchen	1:1000	1:200	Novus Biologicals
XIAP	Kaninchen	1:1000	-	Santa-Cruz
XIAP	Kaninchen	-	1:200	GeneTex
α-Tubulin	Maus	1:8000	-	Sigma

Tab. 7: Sekundärantikörper

Antigen	Ursprung	Verdünnung WB IF		Fluorophor/ enzymatische Aktivität	Hersteller
IgG α-Maus	Schaf	1:10000	-	HRP	GE/Healthcare
IgG α-Kaninchen	Esel	1:10000	-	HRP	GE/Healthcare
IgG α-Ziege	Esel	1:10000	-	HRP	GE/Healthcare
IgG α-Maus	Ziege	-	1:1000	Alexa Fluor 568	Invitrogen
IgG α-Kaninchen	Ziege	-	1:1000	Alexa Fluor 568	Invitrogen
IgG α-Ziege	Esel	-	1:1000	Alexa Fluor 568	Invitrogen
IgG α-Maus	Ziege	-	1:1000	Alexa Fluor 488	Invitrogen
IgG α-Kanninchen	Ziege	-	1:1000	Alexa Fluor 488	Invitrogen

2.1.6 Oligonukleotide

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Folgende Primer wurden für Polymerasekettenreaktionen (PCR), für das Oligoannealing bzw. für Sequenzanalysen verwendet (Tab. 8 bis 10).

Tab. 8: PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
1160 [SURVIVIN_FOR]	AAAGGATCCACATGGGTGCCCCGACGTTG
1161 [SURVIVIN_REV]	TTTGCTAGCATCCATGGCAGCCAGCTGC
CASP3HUMAN_FOR	AAAGGATCCACATGGAGAACACTGAAAAC
CASP3HUMAN_REV	AAAGCTAGCGTGATAAAAATAGAGTTC
LIVIN_FOR	AAAGGATCCACATGGGACCTAAAGACAGTGCC
LIVIN-WT_REV	AAAGCTAGCGGACAGGAAGGTGCGCACGCG
MYC-LIVIN-WT_FOR	AAAGGATCCACGGACCTAAAGACAGTG
MYC-LIVIN-WT_REV	AAAGAATTCTTAGGACAGGAAGGTGC
MYC-TLIVINL_FOR	AAAGGATCCACGGGCAGATCCTGGG
MYC-TLIVINS_REV	AAAGAATTCTTAATCCACGTGGTCCC
pc3-XIAP ₁₋₁₂₀ -GFP_REV	TTTGCTAGCATAGTTTTCAACTTTGTACTG
pc3-XIAP ₁₂₁₋₂₄₂ -GFP_FOR	AAAGGATCCACATGCTGGGAAGCAGA
pc3-XIAP ₁₂₁₋₂₄₂ -GFP_REV	TTTGCTAGCATCAGATTCACTTCGAAT

pc3-XIAP ₁₋₂₃₇ -GFP_REV	AAAGCTAGCAATATTAAGATTCCGGCCCCAAAACAAAGAAGCAATTAGG
pc3-XIAP ₂₃₈₋₄₉₇ -GFP_FOR	AAAGGATCCACATGCGAAGTGAATCTGATGCTGTGAGTTCTGATAGGAATTC
pc3-XIAP ₂₄₃₋₃₂₅ -GFP_FOR	AAAGGATCCACATGGCTGTGAGTTCTGATAGG
pc3-XIAP ₂₄₃₋₃₂₅ -GFP_REV	TTTGCTAGCTGGATAACCATTCTAGCATGTTG
pc3-XIAP ₃₂₆₋₄₂₅ -GFP_FOR	AAAGGATCCACATGGGGTGCAAATATC
pc3-XIAP ₃₂₆₋₄₂₅ -GFP_REV	TTTGCTAGCCTCATCTTGCATACTGTC
pc3-XIAP ₄₂₅₋₄₉₇ -GFP_FOR	AAAGGATCCACATGTCAAGTCAGACTTCA
TLVIN_FOR	AAAGGATCCACATGGGGCAGATCCTGGGCCAGCTG
TLVIN_FORNEW	AAACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG
TLVIN_REV	AAAGCTAGCATCCACGTGGTCCCAGGCTCTGCA
XAF1_FOR	AAAGGATCCACATGGAAGGAGACTTCTCG
XAF1_REV	AAAGCTAGCGCTGAAATTTCTCACTTG
XIAP_FOR	AAAGGATCCACATGACTTTTAACAGTTTTGAAGG
XIAP_REV	AAAGCTAGCAGACATAAAAATTTTTTGCTTGAAAG
XIAP-C-TERM_FOR	AAAGGATCCACATGCGAAGTGAATC
XIAP-N-TERM_REV	AAAGCTAGCAATATTAAGATTCCGGC

Tab. 9: Primer für Oligoannealing

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
XIAP-NES1-FOR	GATCCACATTAAGAAAATAATGGAGGAAAAAATTCAGATAG
XIAP-NES1-REV	CTAGCTATCTGAATTTTTTCCTCCATTATTTTCTTAATGTG
XIAP-NES2-FOR	GATCCACAAAATCTGTATGGATAGAAATATTGCTATCGTTTTTGTTG
XIAP-NES2-REV	CTAGCAACAAAAACGATAGCAATATTTCTATCCATACAGATTTTGTTG
XIAP-NES3N-FOR	GATCCACTTCTTTGTTTTGGGCCGGAATCTTAATATTGCTAG
XIAP-NES3N-REV	CTAGCAATATTAAGATTCCGGCCCCAAAACAAAGAAGTGGATC

Tab. 10: Primer zur Sequenzanalyse

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
CMV-F	CGCAATGGGCGGTAGGCGTG
EGFP-N1-R	ACTTGTGGCCGTTTACGTC
GEX-F	CTTTGCAGGGCTGGCAAG
pcDNA3.1-R	TAGAAGGCACAGTCGAGGCT
pGEX5	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG

2.1.7 Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Klonierungs und Expressionsvektoren sind in Tab. 11 und 12 aufgeführt.

Tab. 11: Klonierungsvektoren

Plasmid	Relevante Merkmale	Hersteller/Referenz
pCDNA3 ⁽⁺⁾	amp ^r , eukaryotischer Expressionsvektor, neo ^r	Invitrogen (Karlsruhe)
pC3-GFP	amp ^r , eukaryotischer Expressionsvektor, neo ^r , zur Klonierung c-terminaler GFP-Fusionsproteine	Labor Prof. Stauber
pC3-GST-GFP	amp ^r , eukaryotischer Expressionsvektor, neo ^r , zur Klonierung c-terminaler GST und n-terminaler GFP-Fusionsproteine	Labor Prof. Stauber
pGex-GST-GFP	amp ^r , prokaryotischer Expressionsvektor, neo ^r , zur Klonierung c-terminaler GST und n-terminaler GFP-Fusionsproteine	Labor Prof. Stauber

Tab. 12: Eukaryontische Expressionsvektoren

Plasmid	relevante Merkmale/codiert für	Referenz
pc3-Borealin _{FI} -Flag	Volllänge Borealin in Fusion mit c-terminalem Flag	Labor Prof. Stauber
pc3-Caspase3-GFP	Volllänge Caspase3 in Fusion mit c-terminalem GFP	Diese Arbeit
pc3-Caspase3-mCh	Volllänge Caspase3 in Fusion mit c-terminalem mCherry	Diese Arbeit
pc3-Crm1 _{FI} -myc	Volllänge Crm1 in Fusion mit c-terminalem c-Myc	Labor Prof. Stauber
pc3-GFP	pcDNA3.1 codiert für GFP	Labor Prof. Stauber
pc3-GFP-XIAP _{FI}	Volllänge XIAP in Fusion mit n-terminalem GFP	Labor Prof. Steller, Rockefeller University, New York

pc3-GST-GFP	pcDNA3.1 codiert für Fusion aus GST und GFP	Labor Prof. Stauber
pc3-GST-XIAP ₁₋₁₂₀ -GFP	Teil von XIAP mit einer potenzieller Exportsequenz und mit n-terminalem GST und c-terminalem GFP	Bachelor Arbeit Tim Nierhaus
pc3-GST-XIAP ₁₂₁₋₂₄₂ -GFP	Teil von XIAP mit einer potenzieller Exportsequenz und mit n-terminalem GST und c-terminalem GFP	Bachelor Arbeit Tim Nierhaus
pc3-GST-XIAP ₂₄₃₋₃₂₅ -GFP	Teil von XIAP mit einer potenzieller Exportsequenz und mit n-terminalem GST und c-terminalem GFP	Bachelor Arbeit Tim Nierhaus
pc3-GST-XIAP ₃₂₆₋₄₂₅ -GFP	Teil von XIAP mit einer potenzieller Exportsequenz und mit n-terminalem GST und c-terminalem GFP	Bachelor Arbeit Tim Nierhaus
pc3-GST-XIAP ₄₂₆₋₄₉₇ -GFP	Teil von XIAP mit einer potenzieller Exportsequenz und mit n-terminalem GST und c-terminalem GFP	Bachelor Arbeit Tim Nierhaus
pc3-GST-XIAP ₄₂₆₋₄₉₇ -GFP	Teil von XIAP mit einer potenzieller Exportsequenz und mit n-terminalem GST und c-terminalem GFP	Bachelor Arbeit Tim Nierhaus
pc3-HtrA2 _{FI} -myc	Volllänge HtrA2 in Fusion mit c-terminalem c-Myc	Labor Prof. Stauber
pc3-Livin _{FI} -GFP	Volllänge Livin in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pc3-Livin _{FI} -mCh	Volllänge Livin in Fusion mit c-terminalem mCherry	Diese Arbeit
pc3-Livin _{FL} -myc	Volllänge Livin in Fusion mit c-Myc	Diese Arbeit
pc3-myc-Livin _{FI}		Diese Arbeit
pc3-myc-Livin _{FI} -GFP	Volllänge Livin in Fusion mit n-terminalem c-Myc und c-terminalem GFP	Diese Arbeit
pc3-myc-Survivin _{FI}	Volllänge Survivin in Fusion mit n-terminalem c-Myc	Diese Arbeit
pc3-myc-tLivin _{long53-292}	c-terminale Livin Variante nach Caspase3 Spaltung mit n-terminalem c-Myc	Diese Arbeit
pc3-myc-tLivin _{short1-52}	n-terminale Livin Variante nach Caspase3 Spaltung mit n-terminalem c-Myc	Diese Arbeit
pc3-Smac _{FI} -myc	Volllänge Smac/DIABLO in Fusion mit c-terminalem c-Myc	Labor Prof. Green, St Jude Children's Research Hospital, Memphis

pc3-Survivin _{FI} -GFP	Volllänge Survivin in Fusion mit GFP	Labor Prof. Stauber
pc3-Survivin _{FI} -myc	Volllänge Survivin in Fusion mit c-Myc	Labor Prof. Stauber
pc3-tLivin _{long53-292} - GFP	c-terminale Livin Variante nach Spaltung durch Caspase	Diese Arbeit
pc3-tLivin _{short1-1-52} - GFP	n-terminale Livin Variante nach Spaltung durch Caspase	Diese Arbeit
pc3-XAF1-GFP	Volllänge XAF1 in Fusion mit c-terminalem GFP	Diese Arbeit
pc3-XAF1-mCherry	Volllänge XAF1 in Fusion mit c-terminalem mCherry	Diese Arbeit
pc3-XIAP ₁₋₁₂₀ -GFP	Teil von XIAP mit einer potenzieller Exportsequenz und c-terminalem GFP	Bachelor Arbeit Tim Nierhaus
pc3-XIAP ₁₂₁₋₂₄₂ -GFP	Teil von XIAP mit einer potenzieller Exportsequenz und c-terminalem GFP	Bachelor Arbeit Tim Nierhaus
pc3-XIAP ₁₋₂₃₇ -GFP	n-terminale XIAP Variante nach Caspase Spaltung mit c-terminalem GFP	Diese Arbeit
pc3-XIAP ₂₃₈₋₄₉₇ -GFP	c-terminale XIAP Variante nach Caspase Spaltung mit c-terminalem GFP	Diese Arbeit
pc3-XIAP ₂₄₃₋₃₂₅ -GFP	Teil von XIAP mit einer potenzieller Exportsequenz und c-terminalem GFP	Bachelor Arbeit Tim Nierhaus
pc3-XIAP ₃₂₆₋₄₂₅ -GFP	Teil von XIAP mit einer potenzieller Exportsequenz und c-terminalem GFP	Bachelor Arbeit Tim Nierhaus
pc3-XIAP _{FI} -GFP	Volllänge XIAP in Fusion mit c-terminalem GFP	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)	amp ^r , eukaryontischer Expressionsvektor, neo ^r	Labor Prof. Stauber

Tab. 13: Prokaryotische Expressionsvektoren

Plasmid	relevante Merkmale	Referenz
pGEX-GST-GFP	Fusionsprotein aus GST-GFP	Labor Prof. Stauber
pGEX-GST-RevNes-GFP	Fusionsprotein aus GST-GFP	Labor Prof. Stauber
pGEX-GST-SV40NLS-GFP	Fusionsprotein aus GST-GFP	Labor Prof. Stauber
pGEX-GST-XIAP _{c-Term} -GFP	Fusionsprotein aus GST-GFP	Diese Arbeit

pGEX-GST-XIAP _{FL} -GFP	Fusionsprotein aus GST-GFP	Diese Arbeit
pGEX-GST-XIAP _{NES1} -GFP	Fusionsprotein aus GST-GFP	Diese Arbeit
pGEX-GST-XIAP _{NES2} -GFP	Fusionsprotein aus GST-GFP	Diese Arbeit
pGEX-GST-XIAP _{NES3} -GFP	Fusionsprotein aus GST-GFP	Diese Arbeit
pGEX-GST-XIAP _{n-Term} -GFP	Fusionsprotein aus GST-GFP	Diese Arbeit
pGex-GST-XIAP _{F1} -GFP	Fusionsproteine aus GST-GFP	Diese Arbeit
pGex-GST-XIAP _{F2} -GFP	Fusionsproteine aus GST-GFP	Diese Arbeit
pGex-GST-XIAP _{F3} -GFP	Fusionsproteine aus GST-GFP	Diese Arbeit
pGex-GST-XIAP _{F4} -GFP	Fusionsproteine aus GST-GFP	Diese Arbeit
pGex-GST-XIAP _{F5} -GFP	Fusionsproteine aus GST-GFP	Diese Arbeit

2.1.8 Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Plasmide wurden in *E.coli* XL2-Blue™ vervielfältigt. Zur heterologen Proteinexpression wurden *E.coli* BL21 (DE3) pLysS verwendet. Dazu wurden die Bakterien in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium, AppliChem, Darmstadt) oder auf LB-Agar Platten (AppliChem, Darmstadt) mit Zusatz der entsprechenden Antibiotika (s. Tab. 5) bei 37°C angezogen.

Tab. 14: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller/Referenz
<i>E.coli</i> XL2-Blue™	recA1, endA1, gyrA96, thi-1 hsdR17, supE44, relA1, lac [F0 proAB lacqZ_M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Stratagene
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F- <i>dcm ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>gal</i> λ(DE3) [pLysS Camr]	Stratagene

2.1.9 Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tab. 15 aufgelistet.

Tab. 15: Zelllinien

Zelllinie	Gewebe/Organismus/Charakteristika	ATCC-Nr./Referenz
293T	Embryonales Nierengewebe, <i>Homo sapiens</i>	CRL-11268
A431	Epidermoides Karzinom, <i>Homo sapiens</i>	DSMZ ACC 91
A431 Survivin _{WT} - GFP stabil	Epidermoides Karzinom, <i>Homo sapiens</i>	Diese Arbeit
HeLa	Zervix Adenokarzinom, <i>Homo sapiens</i>	CCL-2
Vero	Normales Nierengewebe, <i>Cercopithecus aethiops</i>	CCL-81
SK-Mel37	Melanoma Zelllinie, <i>Homo sapiens</i>	Sloan-Kettering Institute NY, USA
NW450	Melanoma Zelllinie, <i>Homo sapiens</i>	Oliver H. Krämer, Frankfurt, Germany

2.1.10 Software/ Computergestützte Analysen

Zur Datenauswertung und Bildbearbeitung wurden neben den Standard Office-Programmen Adobe Photoshop CC (64Bit), AxioVision 4.8 und Canvas 11 verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien

Chemisch kompetente *E.coli* XL2-BlueTM Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,2-1 µg der Plasmid-DNA gemischt. Das Gemisch wurde für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Für die Hitzetransformation wurden die Zellen 45 s bei 42 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend weitere 2 min auf Eis gestellt. Ansätze, die auf eine Ampicillinresistenz oder Carbenicillinresistenz selektioniert werden sollten, wurden direkt nach Auffüllen mit 200 µl LB-Medium auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Ansätze, die auf eine Kanamycinresistenz selektioniert werden sollten, wurden nach dem Auffüllen mit 500 µl LB-Medium erst 1 h bei 37 °C geschüttelt und dann auf mit Kanamycin versetzten LB-Agar-Platten ausplattiert. Die Antibiotika werden von der Stammlösung ausgehend (**s. Tabelle 2.1.7**), mit einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Anzucht transformierter *E.coli* Bakterien erfolgte unter aeroben Bedingungen über Nacht bei 37 °C.

2.2.1.2 Plasmidisolierung aus Bakterien

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde das Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender chromatographischer Reinigung angewendet. Dabei werden die Zellen zuerst durch SDS (Natriumdodecylsulfat) und NaOH aufgeschlossen, sowie die chromosomale und Plasmid-DNA denaturiert. Anschließend erfolgt eine Neutralisation mit Kaliumacetat, die eine Renaturierung kurzer zirkulärer DNA-Fragmente ermöglicht, aber große chromosomale DNA im denaturierten Zustand hält. Die renaturierte Plasmid-DNA befindet sich dann im Überstand und kann durch Zentrifugation von chromosomaler DNA und Zelltrümmern getrennt werden. Die Reinigung der Plasmid-DNA von löslichen Zellbestandteilen erfolgt mit Hilfe von Chromatographiesäulen, an welche die DNA unter hohen Salzkonzentrationen spezifisch bindet. Durch einen Wechsel zu niedrigen Salzkonzentrationen kann die DNA anschließend von der Säule eluiert werden.

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus einer 200 ml Bakterienkultur erfolgte mit dem Nucleo Bond Xtra Midi Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren). Dazu wurden *E.coli* (XL2-Blue™ Bakterien) in LB-Medium unter Selektion der entsprechenden Antibiotika über Nacht angezogen und dann die Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die DNA in 300 µl A. bidest aufgenommen. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus einer 5 ml Bakterienkultur erfolgte mit dem Nucleo Spin Multi-8 Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben.

2.2.1.3 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Kultivierung adhärenter eukaryontischer Zelllinien erfolgte in T75-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht). Zur Versorgung der Zellen wurden auf den jeweiligen Zelltyp abgestimmte Nährmedien verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 13 angegeben ist. Die Anzucht der Zellen erfolgte in wasserdampfgesättigter Umgebung unter Begasung mit 5 % CO₂. Um Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen oder Hefen möglichst zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank durchgeführt.

Tab. 16: Kultivierungsmedien und Medienzusätze für eukaryotische Zelllinien

Kultivierungsmedien/ Medienzusätze	Beschreibung	kultivierte Zelllinien	Hersteller
Antibiotic- Antimycotic	10000 U/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin sulfate, 25 µg/ml Amphotericin B	-	Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Antibiotic-Antimycotic	293T, HeLa, A431, Vero	Invitrogen
DMEM + 800	Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 20% FCS, 1% L-Glutamin, 1 % Antibiotic-Antimycotic, 800 µg/ml Geneticin (G148)	A431_Survivin _{wt} -GFP (+/-) A431_Survivin NES _{mut} -GFP	Invitrogen (Karlsruhe)
FCS	Fötales Kälberserum, Serum-Zusatz für Zellkulturmedien	-	Invitrogen
L-Glutamin	Aminosäure-Zusatz für Zellkulturmedien	-	Invitrogen
OptiMEM	Modifikation von MEM (Eagle's) mit einem reduzierten Serum- und Proteinanteil	Transfektions-medium	Invitrogen

2.2.1.4 Zellpassage

Adhärente Zelllinien haften durch die besondere Beschichtung der Zellkulturflaschen an deren Boden und müssen deshalb zur weiterführenden Kultivierung enzymatisch oder mechanisch abgelöst werden (Passage). Dies wurde alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Dazu wurde das alte Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen dann mit 6 ml PBS (Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen, um FCS-Rückstände zu entfernen, die die Wirkung des Trypsins inhibieren könnten. Danach wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin bei 37 °C auf einer Heizplatte 3-10 min inkubiert, damit die Adhäsionsproteine an der Zelloberfläche gespalten werden und sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche ablösen können. Nach mikroskopischer Sichtkontrolle wurde die Trypsin-Aktivität durch Zugabe von 8 ml des entsprechenden Kultivierungsmediums abgestoppt. Abschließend wurde die Zellsuspension in dem entsprechenden Kultivierungsmedium in einem Gesamtvolumen von 10 ml je nach Zelldichte entsprechend verdünnt und in eine neue sterile Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.5 Mykoplasmenkontrolle

Mykoplasmen gehören zu den kleinsten sich selbst vermehrenden Bakterien. Sie parasitieren vor allem extrazellulär. Aufgrund ihrer Größe sind Mykoplasmen im Mikroskop nicht sichtbar, kontaminieren aber häufig Zellkulturen. Die Kontamination mit Mykoplasmen greift in den Stoffwechsel der Zellen ein, wodurch das Wachstumsverhalten und die Eigenschaften der Zellen verändert werden können. Aus diesem Grund wurden frisch aufgetaute Zellen zunächst auf Mykoplasmen getestet.

Der Nachweis von Mykoplasmen erfolgte mit dem PlasmotectTM Mycoplasma Detection Kit (Invivogen, Toulouse) nach Angaben des Herstellers. Mykoplasmen werden dabei über den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) erkannt. In Anwesenheit von Mykoplasmen aktiviert TLR2 NF- κ B und weitere Transkriptionsfaktoren, die dafür sorgen, dass SEAP (*secreted embryonic alkaline phosphatase*) in den Überstand abgegeben wird. Dies kann durch eine Blau- bis Violettfärbung des Mediums detektiert werden.

2.2.1.6 Eliminierung von Mykoplasmen

Mit Mykoplasmen infizierte Zellen müssen vor der weiteren Verwendung von der Kontamination befreit werden. Dafür wurden die Wirkstoffe Myco-I und Myco-II (AppliChem) verwendet. Myco-I basiert auf dem Antibiotikum Tiamulin, Myco-II auf dem Tetracyclinderivat Minocyclin. Die Behandlung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Danach wurden die Zellen 3-4 Passagen ohne Antibiotika kultiviert und dann erneut wie unter 2.2.1.5 beschrieben auf Mykoplasmen getestet.

2.2.1.7 Langfristige Lagerung von Zellen

Die langfristige Lagerung von Zellen erfolgte in FCS, 10 % (v/v) DMSO. DMSO verhindert schädigende Kristallbildung beim Einfrieren. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 2 ml Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst, in 8 ml Medium resuspendiert und in ein Falcon überführt. Die Zentrifugation erfolgte 5 min bei 300 g. Das Zellpellet wurde dann zunächst in 7 ml FCS resuspendiert, danach mit 7 ml FCS, 20 % (v/v) DMSO gemischt und anschließend wurde jeweils 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden in Gefrierbehältern der Firma Nalgene (Roskilde, Dänemark) um 1 °C pro Minute auf -80 °C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -173 °C gelagert.

2.2.1.8 Auftauen von Zellen

Die gefrorenen Zellen wurden zuerst unter Schwenken im Wasserbad aufgetaut, dann in ein Falcon mit 1 ml des entsprechenden Kultivierungsmediums überführt und mit weiteren 8 ml des Kultivierungsmediums gemischt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 300 g pelletiert um DMSO-Reste zu entfernen. Das Pellet wurde in frischem Medium aufgenommen und die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.9 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen

Die transiente Transfektion eukaryontischer Zellen bezeichnet die kurzzeitige Aufnahme (24-48 h) von Plasmid-DNA in die Zelle, wobei die auf der Plasmid-DNA codierten Gene mit Hilfe eines eukaryontischen Promotors exprimiert werden können.

Für die transiente Transfektion von 293T-Zellen in einer 3,5 cm-Schale mit dem kationischen Polymer Polyethylenimin (PEI) (Sigma, Taufkirchen) wurden zunächst 60 µl steriles PBS (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10,8 µl einer 10 mM PEI-Lösung vermischt. Dazu wurde ein Gemisch aus 60 µl sterilem PBS und 4 µg DNA gegeben. Nach kurzem Vortexen wurde die Lösung auf die Zellen getropft und für 24-48 h inkubiert. Für die Transfektion von 293T-Zellen in 10 cm Schalen wurde jeweils die vierfache Menge der Reagenzien eingesetzt.

Alle anderen Zelllinien wurden mit Lipofectamine2000 (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert. Dazu wurden zu 125 µl OptiMEM 3 µl Lipofectamine2000 pipettiert, das Gemisch gut gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden 125 µl OptiMEM mit 2 µg DNA gemischt, gevortext und ebenfalls für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt, erneut kurz gevortext und weitere 20 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gemisch vorsichtig zu den Zellen pipettiert, die anschließend dann 24-48 h im Inkubator inkubiert wurden.

2.2.1.10 Leptomycin B-Behandlung von adhärenenten Zellen

Leptomycin B (LMB) ist ein Stoffwechselprodukt von *Streptomyces* spp. und kann als spezifischer Kernexportinhibitor verwendet werden. LMB alkyliert den Exportrezeptor CRM1 durch Glykosylierung eines Cysteins (C529). LMB wird zur Behandlung in Zellmedium (DMEM) verdünnt und mit einer Endkonzentration von 10 nM eingesetzt. Da LMB zytotoxisch wirkt, wird eine Inkubation von länger als 3 Stunden vermieden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz. Die PCR besteht aus 20-40 Zyklen. Jeder Zyklus umfasst dabei drei Temperatur-Stufen. Zunächst erfolgt die Denaturierung bei 95-98 °C, um das doppelsträngige (ds) DNA-*Template* in einzelsträngige (ss) DNA zu schmelzen. Dann folgt der *Annealing*-Schritt bei einer um 3-5 °C niedrigeren Temperatur als der berechneten Schmelztemperatur der verwendeten Primer, sodass sich diese an die ssDNA-Moleküle anlagern können. Als dritter Schritt folgt die Extension, wobei die DNA-Polymerase den neuen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Dieser Schritt erfolgt beim Temperaturoptimum der jeweils verwendeten DNA-Polymerase. Die Verlängerungszeit ist sowohl abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, als auch von der eingesetzten Polymerase. Diesen Zyklen geht eine initiale Denaturierung bei 95-98 °C für 30 Sekunden voraus und eine finale Extension beim Temperaturoptimum der DNA-Polymerase folgt für mehrere Minuten, um sicherzustellen, dass die Verlängerung aller verbleibenden ssDNA vollständig abgeschlossen ist.

Für die PCR-Reaktionen in dieser Arbeit wurde die BioRad iProof High-Fidelity DNA-Polymerase (BioRad, München) verwendet. Das Temperaturoptimum dieser Polymerase liegt bei 98 °C, die Verlängerungszeit beträgt 15-30 Sek/kb. Die Ergebnisse der PCR-Reaktionen wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von dsDNA anhand der Anzahl der Basenpaare, z.B. nach einer PCR Reaktion oder einem Restriktionsverdau. Die Agarose-Konzentration des Gels wird dabei abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente gewählt. In dieser Arbeit wurden vorwiegend Gele mit einer Konzentration von 1 % Agarose (w/v) verwendet. DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer 1:10 versetzt und bei 100 V in einem Agarose-Gel mit 1:15000 Ethidiumbromid in 1x Tris-Acetat-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder von Fermentas verwendet. Nach der Elektrophorese erfolgte die Visualisierung der DNA unter UV-Licht.

50x Tris-Acetat Puffer	400 mM Tris-Acetat, 10 mM EDTA
DNA-Probenpuffer	20 % (w/v) Glycerin, 100 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol

2.2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem Nucleo Spin Extract II Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde das gewünschte DNA-Fragment zunächst mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und im letzten Schritt der Reinigung in 20 µl Elutionspuffer eluiert.

2.2.2.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde bei einer Absorptionswellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml. Bei einer Absorptionswellenlänge von 280 nm wurden Verunreinigungen durch Proteine detektiert, Verunreinigungen durch Salze und organische Substanzen wurden bei 230 nm gemessen. Das Verhältnis von $A_{260/280\text{nm}}$ und $A_{260/230\text{nm}}$ sollte für reine DNA jeweils bei 1,8 liegen.

2.2.2.5 DNA-Restriktion und -Ligation

Die Restriktion von Vektoren und Inserts erfolgt mit Restriktionsenzymen der Firma New England BioLabs (NEB, Schwalbach) in den von NEB empfohlenen Puffern für 3-4 h bei 37 °C. Für einen analytischen Verdau wurden 0,2-1 µg DNA eingesetzt, für einen präparativen Verdau 5-10 µg DNA. Nach erfolgreichem Restriktionsverdau wurde die DNA mit dem Nucleo Spin Extract II Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

Die anschließende Ligation von verdautem Vektor und Insert erfolgte mit der T4-DNA-Ligase TaKaRa (Mobitec, Göttingen). Dazu wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:4 gemischt, mit dem gleichen Volumen der DNA-Ligase versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit H₂O anstelle der Insert-DNA. Um den Erfolg der Ligation zu überprüfen, wurden anschließend 50 µl kompetente *E.coli* Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert und bei 37 °C über Nacht auf LB-Agar-Platten angezogen. Ligierte Plasmid-DNA kann dabei von *E.coli* Zellen aufgenommen und vervielfältigt werden. Selektionsmarker wie Ampicillin- oder Kanamycin-Resistenzen auf den Plasmiden ermöglichen die Selektion transformierter *E.coli* Zellen auf Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten. Zur Kontrolle der ligierten Plasmid-DNA wurde vor der weiteren Verwendung ein Testverdau und eine Testtransfektion (Fluoreszenz ja oder nein) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA zur Sequenzierung gegeben (s. 2.2.2.7).

2.2.2.6 Oligoannealing

Bei einer Ligation können synthetisch hergestellte komplementäre Oligonukleotide als Insert verwendet werden. Dazu wurden zunächst die 5'-Enden der Oligos mit einer Phosphonukleotidkinase (PNK, NEB) phosphoryliert. Für diese Reaktion wurden je 1 µg der Primer mit 1 µl PNK-Puffer sowie je 0,5 µl dNTPs und PNK versetzt und mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei 37 °C. Für die anschließende Hybridisierung (*Annealing*) wurden beide Phosphorylierungsansätze vereinigt. Das Gemisch wurde dann in ein auf 100 °C erhitztes Wasserbad gegeben und auf RT abgekühlt. Anschließend erfolgte die Ligation mit dem entsprechenden verdauten Vektor (**siehe 2.2.2.5**).

2.2.2.7 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von Plasmiden zur Überprüfung der Klonierungen wurde nach dem Prinzip des Kettenabbruchs von Sanger (Sanger *et al.* 1977) von der Firma GATC (Konstanz) und LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Hierfür wurden 20 µl DNA in einer Konzentration von 30-100 ng/µl sowie (bei nicht von der Firma gestelltem Primer) 20 µl Primer in einer Konzentration von 10 pmol/µl an die Firma versendet. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit BioEdit.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Die Isolierung von Proteinen aus einer Zellsuspension erfolgte mit Hilfe eines chemischen Zellaufschlusses, wobei EDTA als Komplexbildner dazu diente, die Zellmembran zu permeabilisieren sowie Detergenzien wie Natrium-deoxycholat und Np-40 um Membranproteine zu solubilisieren.

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die konfluenten Zellen einer Zellkulturschale mit Trypsin oder einem Zellschaber abgelöst, in ein Falcon überführt und bei Raumtemperatur für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und erneut 5 min bei 300 g zentrifugiert, diesmal jedoch bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80-100 µl RIPA-Puffer resuspendiert, für zirka 20 sek. bei 95 % mit dem Sonopuls der Firma Bandelin sonifiziert und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 20000 g

pelletiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit einem Bradford-Assay bestimmt (s. 2.2.3.6).

RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % (v/v) Np-40, 1 % (v/v) Natrium-deoxycholat, 1 mM DTT, 1 × Protease-Inhibitor Cocktail (Roche), 1 mM PMSF, bei -20 °C gelagert
modifizierter RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Natrium-deoxycholat, 1 % Triton-X-100, 1 × Protease-Inhibitor Cocktail (Roche), bei -20 °C gelagert

2.2.3.2 *In vitro*-Translation

Zur *in vitro*-Translation wurde der TNT T7 Quick Master Mix (Promega, Madison, USA) verwendet. Das Reticulozyten-Lysat wurde in der Hand aufgetaut und auf Eis gestellt. Es wurden 40 µl davon mit 4 µl 1 mM Methionin, 2 µg Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 50 µl angesetzt. Nach Inkubation für 90 min im 30 °C Wasserbad wurde das Produkt aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 Pull Down

Für den Pull Down wurde zunächst rekombinantes Protein (GST-x-GFP) wieder an Sepharose-Beads gebunden. Es wurden 100 µl rekombinantes Protein mit 25 µl Sepharose-Beads in PBS mit complete EDTA-free protease inhibitor cocktail für 30 min auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Die dann proteintragenden Sepharose-Beads wurden zweimal mit 500 µl PBS und einmal mit 500 µl Bindepuffer gewaschen (3500 rpm, 4 °C, 1 min). Für einen Pull Down-Ansatz wurden 25 µl der beladenen Sepharose-Beads mit 20 µl *in vitro* translatiertem Crm1-Myc, 10 µl rekombinantes GST-RanQL in 500 µl Bindepuffer für 4h oder 30 min auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Die Sepharose-Beads wurden dreimal mit 500 µl Bindepuffer gewaschen (3500 rpm, 4 °C, 1 min), wobei von dem Überstand nach der Inkubation 25 µl für eine Kontrolle auf dem Gel aufgehoben wurde. Die Proteine wurden von den Beads durch Zugabe von 25 µl 2x SDS-Ladepuffer und durch Aufkochen bei 95 °C für 10 min eluiert, auf ein 12,5 % SDS-Gel geladen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Kontrolle wurden auf jedem Gel 2 µl *in vitro*-translatiertes Crm1-Myc und 25 µl des Überstands nach der Inkubation aufgetragen. Der Nachweis, des vom rekombinanten Protein gebundenen Crm1-Myc erfolgte mit dem Myc-spezifischen Antikörper von NEB. Die Bead-Beladung wurde anschließend mit dem GFP-Antikörper (sc-8334, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) überprüft.

2.2.3.4 Ko-Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation (IP) kann ein Protein mit Hilfe eines Antikörpers aus einem Totallysat isoliert und im anschließenden Western-Blot analysiert werden. Dabei wird das Protein von einem spezifischen Antikörper gebunden, der über dessen Fc-Teil an Protein-A/G-Agarose bindet. Durch Zentrifugation können die gebundenen Proteine vom Überstand abgetrennt werden. Für die Ko-Immunpräzipitation werden transient transfizierte 293T Zellen (5×10^7 Zellen pro 10 cm Schale) verwendet. Nach Lyse dieser Zellen in 1ml IP-Lysepuffer mit anschließender Sonifizierung, wird das Lysat bei 14000 rpm und 4 °C abgefugt. Der Überstand wird in ein frisches Gefäß überführt. 30 µl davon (3 % *Input*) werden bei -80 °C weggefroren und der Rest mit 50 µl Antikörper-gekoppelten *Nanobeads* der Firma Miltenyi (Bergisch Gladbach) 30 min auf Eis inkubiert. Dann werden die Magnetsäulen des Isolations-*Kits* im Magneten platziert und mit 200 µl Lysepuffer äquilibriert. Anschließend wird je ein Lysat pro Säule aufgetragen. Dann wird vier Mal mit 200 µl Lysepuffer und anschließend mit 100 µl Waschpuffer2 des *Kits* gewaschen. Nach vollständigem Abtropfen der Säulen werden Auffanggefäße darunter platziert und pro Säule 20 µl 95 °C heißer Elutions-Puffer aufgetragen. Nach fünf minütiger Inkubation erfolgt dann die vollständige Elution mit weiteren 50 µl 95°C heißer Elutions-Puffer. Das Eluat und der denaturierte *Input* werden dann auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgt im Western-Blot.

2.2.3.5 Fraktionierung von Zelllysaten

Bis zur eigentlichen Lyse wird analog zur Herstellung von Gesamt-Zelllysat verfahren. Die eigentliche Lyse beginnt mit der Zugabe von 750 µl des eiskalten hypotonischen Lyse-Puffers zum Zellpellet. Nach gründlicher Resuspension, wird der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert, wobei etwa alle 5 min gevortext wird. Anschließend folgt eine Zentrifugation von 800 g für 15 min bei 4 °C. Der erhaltene Überstand repräsentiert die Zytoplasma-Fraktion, diese wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, zur Präzipitation etwaiger Verunreinigungen bei 12500 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und 500 µl des Überstands bis zum Gebrauch bei -80 °C eingefroren. In der Zwischenzeit wird das Pellet in 750 µl Kern Isolations-Puffer resuspendiert, 5 min im Eis inkubiert und schließlich bei 800 g für 15min bei 4°C zentrifugiert. Der letzte Schritt wird zweimalig wiederholt. Dann wird das Pellet zur Gewinnung der Kern-Fraktion in 750 µl Kern-Lyse-Puffer gründlich resuspendiert und unter gelegentlichem Vortexen 30 min im Eis inkubiert. Anschließend wird das Lysat bei 12500 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und dann 500 µl des Überstands (= Kern-Fraktion) bei -80°C eingefroren. Die Analyse erfolgt durch Western-Blot.

Hypotonischer Lyse-Puffer	10 mM HEPES pH 7.9, 0,5 mM DTT, 1,5mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 1 × Protease-Inhibitor Cocktail (Roche), H ₂ O, bei -20 °C gelagert
modifizierter RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Np-40, 0,5 % (v/v) Natrium-deoxycholat, 1 × Protease-Inhibitor Cocktail (Roche), H ₂ O, bei -20 °C gelagert
Puffer S1	0,25 mM Saccharose, 10 mM MgCl ₂ , 1 × Protease-Inhibitor Cocktail (Roche), H ₂ O, bei -20 °C gelagert
Puffer S3	0,88 mM Saccharose, 0,5 mM MgCl ₂ , 1 × Protease-Inhibitor Cocktail (Roche), H ₂ O, bei -20 °C gelagert

2.2.3.6 Proteinquantifizierung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Bradford-Assay durchgeführt, welcher darauf beruht, dass Coomassie-Brilliant-Blau G-250 an Proteine bindet, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm erhöht. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm gilt dann als Maß für die Proteinkonzentration.

Zunächst wurde 2 µl des Proteinlysats mit 798 µl PBS verdünnt. Dann wurden 200 µl der Bradfordreagenz (BioRad, München) zugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 1 ml vorlag. Nach gutem Vortexen wurde die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Eichkurve.

2.2.3.7 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidgelsystem nach Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970) verwendet. Die Zugabe des negativ geladenen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat), welches an alle Proteine bindet, bewirkt dabei, dass diese eine einheitliche Ladungsdichte erhalten. Somit ist es möglich die Proteine nur nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufzutrennen, wobei kleine Proteine das Netzwerk aus Polyacrylamid schneller passieren als große Proteine. Die Polyacrylamidkonzentration bestimmt die Porengröße im Gel und wird in Abhängigkeit von der Proteingröße ausgewählt. SDS-Gele wurden nach dem Schema in **Tab. 17** hergestellt.

Tab. 17: Ansatz zur Herstellung von Polyacrylamidgelen

	Trenngel				Sammelgel (4 %)
	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	
Aqua bidest.	2,4 ml	2,0 ml	1,6 ml	1,2 ml	2,5 ml
Trenngelpuffer	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	-	1,35 ml
Acrylamid	1,2 ml	1,6 ml	2,1 ml	2,5 ml	0,65 ml
APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Für ein 1 mm dickes Gel wurde zuerst das Trenngel gegossen und mit 100 µl Isopropanol überschichtet, damit eine gerade Kante als spätere Abgrenzung zum Sammelgel entstehen konnte. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol mit einem Papierstreifen entfernt. Das Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen und ein Kamm für 10 oder 15 Taschen hineingesteckt. Das Sammelgel musste noch mindestens 15 min auspolymerisieren, bevor das Gel verwendet werden konnte.

Bevor die Proteinproben (40 µg) aufs Gel aufgetragen wurden, wurden sie mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach dem Auftragen auf das SDS-Gel erfolgte die elektrophoretische Auftrennung im Sammelgel bei 90 V und im Trenngel bei bis zu 150 V in 1x SDS-Laufpuffer.

Acrylamid/Bisacrylamid	30 % (w/v)/ 0,8 % (w/v)
APS	10 % (w/v) in H ₂ O
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer (1x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (5x)	5 mM EDTA, 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 7,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 15 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) Glycerol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,9, 0,4 % (w/v) SDS

2.2.3.8 Western-Blot (Tank Blot)

Der Western Blot ermöglicht es, Proteine, die zuvor elektrophoretisch in einem SDS-Gel aufgetrennt wurden, durch eine zweite Elektrophorese auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran zu transferieren. Die Proteine bleiben durch ihre mit SDS erzeugte negative Ladung an der positiv geladenen Membran haften, und zwar an genau der gleichen Position, die sie auch im SDS-Gel eingenommen hatten. Durch Immundetektion mit Antikörpern können

die jeweiligen Proteine, gegen die die Antikörper gerichtet sind, spezifisch sichtbar gemacht werden. Die Immundetektion erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt bindet der Primärantikörper spezifisch an das entsprechende Protein. Im zweiten Schritt wird dieser dann von einem Sekundärantikörper gebunden, der alle Primärantikörper des gleichen Ursprungsorganismus erkennt. Der Sekundärantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, das bei Zugabe eines Substrats eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Die entstehende Lumineszenz kann auf einem Röntgenfilm detektiert und damit die Bindung des Antikörpers visualisiert werden. Ein häufig verwendetes Enzym ist die Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP), welche die Oxidation von Luminol katalysiert.

Zunächst musste die PVDF-Membran (Pall, Dreieich) aktiviert werden. Dazu wurde sie 1 min in Methanol geschwenkt und danach in Transferpuffer mit 20 % Methanol zusammen mit dem SDS-Gel äquilibriert. Das Whatman-Papier und die Pads wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Alle Komponenten wurden im Anschluss folgendermaßen geschichtet: ein Pad, zwei Whatman-Papiere, das SDS-Gel, die Membran, zwei Whatman-Papiere und ein Pad. Diese Schichtung wurde in die Blotting-Apparatur (BioRad, München) eingespannt, und die Kammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt. Das Blotting erfolgte 100 min bei 360 mA und 4 °C. Vor der Detektion der Proteine wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Dies geschah je nach Primärantikörper in 5 % Milchpulver/TBST, 5 % BSA/TBST oder Roti-Block (Roth, Karlsruhe) für 1-2 h bei RT.

Die entsprechenden Primärantikörper wurden in 5 % Milchpulver/TBST oder 5 % BSA/TBST verdünnt auf die Membran gegeben (**s. Tab. 6**) und 1 h bei RT oder bei 4 °C ü.N. unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 5 min in TBST gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran 1 h mit dem entsprechend verdünnten Sekundärantikörper (**vgl. Tab. 7**) unter Schütteln bei RT inkubiert. Danach wurde erneut dreimal 5 min in TBST gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mit den Reagenzien Amersham ECL oder ECL Plus™ (GE Healthcare, München) über Chemilumineszenz nach Angaben des Herstellers detektiert.

Transferpuffer (1x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,01 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol
Inkubationspuffer für Antikörper	5 % Milchpulver/TBST oder 5 % BSA/TBST

2.2.3.9 Entfernen von an Membranen gebundenen Antikörpern

Membranen, die bereits im Western Blot analysiert wurden, wurden für weitere oder erneute Proteinnachweise durch das sogenannte „Stripping“ von gebundenen Antikörpern gereinigt. Die meisten „Stripping“-Protokolle denaturieren die gebundenen Antikörper entweder bei sauren/basischen pH Werten oder bei Einwirkung von Detergenzien (Laborjournal, 2007). Hier wurde die Membran 30 min bei RT in Re-Blot Plus Lösung (Millipore, Schwalbach) inkubiert und anschließend 15 min in TBS bzw. PBS gewaschen. Im Anschluss musste die Membran erneut blockiert werden, bevor die Inkubation mit weiteren Antikörpern, wie unter **2.2.3.8** beschrieben, stattfinden konnte.

2.2.3.10 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die sich im pGEX-Vektor befindenden Expressionskonstrukte in kompetente *E.coli* Zellen des Stammes BL21 (DE3) pLysS transformiert (s. **2.2.1.1**). Zur heterologen Expression wurden zunächst Übernacht-Vorkulturen angezogen (50 ml), die dann 1:5 in frisches Medium in Kulturkolben mit Schikane überimpft wurden (250 ml). Die Induktion der Expression der GST-Fusionsproteine erfolgte bei einer $OD_{600}=0,6-0,8$ durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) über Nacht bei 18 °C. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3900 g, 15 min, 4 °C) geerntet.

2.2.3.11 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Das Bakterien-Pellet wurde in 10 ml kaltem PBS-Puffer mit DNaseI (Endkonzentration 50 μ g/ml) resuspendiert. Nach Zugabe von 26 μ l $MnCl_2$ (1 M), 260 μ l $MgCl_2$ (1 M) sowie 500 μ g/ml Lysozym folgte eine Inkubation auf Eis für 15 min. Anschließend wurde die Suspension 7 x 30 sek. bei 100 % mit dem Sonopuls der Firma Bandelin sonifiziert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (3900 g, 45 min, 4 °C) entfernt. Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte über Affinitäts-Chromatographie mit Glutathion-Sepharose-Partikel (GE Healthcare), an die der GST-Anteil des rekombinanten Proteins binden kann. Der Überstand wurde mit 300 μ l Glutathion-Sepharose gemischt und für 1-2 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-Partikel einmal mit 10 ml PBS/1 % Triton-X-100 und zweimal mit 10 ml PBS gewaschen (430 g, 5 min, 4 °C). Das an die Glutathion-Sepharose gebundene rekombinante GST-Fusionsprotein wurde dann in 3 ml PBS resuspendiert und in eine PolyPrep-Säule (BioRad) überführt. Nachdem sämtliche

Flüssigkeit abgefließen war, wurde die Säule unten verschlossen. Für die Elution des GST-Fusionsproteins von der Glutathion-Sepharose wurde 300 µl des frisch hergestellten Elutionspuffers auf die Säule gegeben, unter Schütteln 10-20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann das Eluat aufgefangen. Das eluierte Protein wurde über Nacht bei 4 °C gegen PBS in Slide-A-Lyzer 10K Kassetten (Pierce/Perbio) dialysiert. Die Lagerung des rekombinanten Proteins erfolgte aliquotiert nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des Bradford-Assays.

Elutionspuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 15 mM Glutathion reduziert
Waschpuffer	50 mM Tris-HCL pH 7.5, 100 mM NaCl, 1mM DTT
Lysepuffer	Waschpuffer, 1 mM PMSF

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

2.2.4.1 Epi-Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszierende Moleküle, sogenannte Fluorophore, absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und gehen somit in einen angeregten Zustand über. Durch Emission eines Lichtquants, gelangt das angeregte Fluorophor wieder in seinen energetischen Grundzustand. Im Unterschied zur konventionellen Lichtmikroskopie wird das Anregungslicht bei der Fluoreszenzmikroskopie durch zwei Filtersets geleitet. Der erste Filter lässt nur die Wellenlängen durch, die das Fluorophor spezifisch anregen. Der zweite Filter lässt hingegen nur die emittierten Wellenlängen durch und sorgt so dafür, dass kein Licht der Anregungswellenlänge zum Detektor gelangt.

Die Fluoreszenzmikroskopie wird häufig genutzt, um spezifisch die Lokalisation eines Proteins in der Zelle oder auch die relative Lokalisation mehrerer Proteine zueinander in der Zelle zu untersuchen. Eine weit verbreitete Technik dazu ist die Kopplung von Antikörpern mit Fluorophoren, welche als spezifische und vielseitige Färbereagenzien fungieren können. Beispiele für Fluorophore sind AlexaFluor, Cy3 und Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Neben den Fluorophoren sind auch fluoreszierende Proteine für die Fluoreszenzmikroskopie wichtig geworden, besonders das grün-fluoreszierende Protein GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* und seine Derivate. GFP kann zum Beispiel als Fusions-Protein zur Markierung von Proteinen verwendet werden. Die Fluoreszenz von GFP beruht dabei auf der Autozyklisierung und Oxidation von drei benachbarten Aminosäuren (Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇). Ausserdem können auch Fluoreszenzfarbstoffe wie Hoechst 33342 oder DAPI verwendet werden um u.a. die DNA des Zellkerns an zu färben. Der Farbstoff interagiert mit der DNA und emittiert Licht im Bereich Blau bis Cyan.

Analysen der Fluoreszenz von Zellen auf Mikroskopierschälchen (3,5 cm) erfolgten mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop der Firma Carl Zeiss (Axio Observer 2.1). Die Zellen wurden mit einer CCD-Kamera aufgenommen und entsprechend mit dem computergestützten Bilderfassungssystem AxioVision 4.8 der Firma Carl Zeiss visualisiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Photoshop CC (64Bit).

2.2.4.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie ist eine besondere Form der Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei werden mit fokussierten Laserstrahlen einzelne Punkte des Objektes beleuchtet und nicht, wie bei der Epifluoreszenzmikroskopie, das gesamte Präparat. Mit Hilfe computergestützter Techniken kann durch die Aufnahme jedes einzelnen Punktes des Präparats das gesamte Bild rekonstruiert werden. Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie bietet den Vorteil, dass Hintergrundsignale aus höher oder tiefer liegenden Schichten ausgeblendet werden können und die Tiefenschärfe somit erhöht wird.

Es wurde ein konfokales Laserscanning Mikroskop TCS-SL der Firma Leica (Wetzlar) für die Analysen verwendet. Die Präparate wurden mit einer CCD-Kamera aufgenommen, mit dem computergestützten Bilderfassungssystem LASAF Image Analysis der Firma Leica visualisiert und mit Photoshop CC (64Bit) ausgewertet.

2.2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Mit der indirekten Immunfluoreszenzfärbung können zelluläre oder überexprimierte Proteine nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst in mit Gelatine (0,1 % (v/v) Gelatine, H₂O) beschichteten Mikroskopierschälchen (3,5 cm) ausgesät und zu einem gewünschten Zeitpunkt durch Inkubation mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 15 min bei RT fixiert. Wenn kein Membranprotein gefärbt wurde, wurde die Zellmembran der fixierten Zellen nach vorsichtigem Waschen mit PBS durch Behandlung mit dem Detergenz Triton-X (0,1 %) für 10 min permeabilisiert, da nur so eine später applizierte Antikörperlösung bis in den Zellkern vordringen kann. Bei der Färbung von Membranproteinen kann die Permeabilisierung der Zellmembran ausgelassen werden. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Primärantikörper, der das entsprechende Protein bindet, in 10% BSA/ TBST für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernen überschüssigen Primärantikörpers durch Waschen mit PBS erfolgte anschließend die Detektion des Primärantikörpers durch Inkubation mit einem Sekundärantikörper in 10% BSA/ TBST für 1 h bei RT im Dunkeln. Der Sekundärantikörper ist mit dem Fluorophor AlexaFluor568 oder AlexaFluor488 gekoppelt und erkennt alle

Primärantikörper eines gleichen Ursprungsorganismus. Die gefärbten Zellen wurden zur späteren Analyse in 0,1% Na-Acid/ PBS im Kühlschrank aufbewahrt.

2.3 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion dient dem gezielten und effizienten Einbringen von Proteinen und DNA in das Zytoplasma oder den Zellkern von adhärenenten Zellen. Vero-Zellen eignen sich aufgrund ihres großen Zytoplasmas, ihrer gut sichtbaren Kerne und ihrer starken Adhärenz hierzu besonders gut. Mit der Methode der Mikroinjektion können unter anderem Kernimport- und Export-Signale von Proteinen auf ihre Aktivität hin untersucht werden. Das zu injizierende Protein soll eine Konzentration von etwa 2-5 µg/µl haben. Vor der Injektion werden die Proteine oder die DNA mindestens für 30 min abzentrifugiert (4 °C, 14.000 rpm), um mögliche Aggregate und Verunreinigungen zu entfernen. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Injektions-Kapillaren werden mit dem Mikropipetten-Puller (Sutter Instrument) gezogen und mit 8 µl Protein -Lösung befüllt. Anschließend wird die Kapillare in die Halterung am Femto Jet AIS2 von Eppendorf eingespannt. Vor der Injektion werden die am Tag zuvor ausgesäten Vero Zellen mit 20 µl HEPES-Puffer versetzt. Um die Zerstörung der Zell-Membranen zu vermeiden, können während der Mikroinjektion sowohl Druck als auch Dauer der Injektion ständig angepasst werden.

3. Ergebnisse

3.1 Lokalisationsanalyse des Apoptose-Inhibitorproteins XIAP

Die „*Inhibitoren der Apoptose*“ (IAP)-Proteinfamilie spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Zelltod (Apoptose) und Zellüberleben. Da eine Dysregulation auf dieser Ebene zur Entstehung von Tumoren führen kann, stehen die IAPs vermehrt im Mittelpunkt vieler tumorbezogener Forschungsthemen.

Von den bisher acht im Menschen identifizierten Mitgliedern der IAP-Proteinfamilie (Abb. 6) sind Survivin und XIAP bislang am besten untersucht. Für Survivin, welches zusätzlich als Regulator der Mitose agiert, wurde ein Leucin-reiches Exportsignal (NES) beschrieben, welches mit dem nukleären Exportrezeptor Crm1 interagiert. Diese Wechselwirkung ist für die duale biologische Funktion von Survivin essentiell. Survivin übt so nicht nur die Rolle als Apoptose-Inhibitor aus, sondern sorgt während der Mitose als Teil des „*Chromosomal Passenger Complex*“ für eine korrekte Verteilung der Chromosomen und einen reibungslosen Ablauf der Zellteilung.

Da XIAP ebenfalls nicht nur eine Rolle in der Apoptose-Inhibition einnimmt, sondern in zahlreichen Signalwegen von enormer Bedeutung ist (Galbán und Duckett 2010), soll im Rahmen des ersten Teils dieser Arbeit am Beispiel von XIAP untersucht werden, ob innerhalb der IAP-Familie weitere Exportsignale vorkommen und inwieweit diese selbst funktionell die Regulation der Apoptose oder weitere biologische Funktionen dieser Proteine unterstützen können.

3.1.1.1 Chemische Exportinhibition

Um zu untersuchen, ob XIAP ein mögliches Exportsignal (NES) in seiner Sequenz trägt, wurde zunächst XIAP_{WT}-GFP 24 h transient in Hela-Zellen exprimiert und diese dann mit dem Exportinhibitor Leptomycin B (LMB) (10 nM) behandelt. Als Negativkontrolle wurden GFP und als Positivkontrolle Survivin_{WT}-GFP im Experiment analog mitgeführt.

XIAP_{WT}-GFP lokalisiert zunächst im Zytoplasma der Zelle und nur zu sehr geringen Anteilen im Zellkern (Abb. 14A). In Gegenwart des Export-Inhibitors LMB akkumuliert XIAP_{WT}-GFP im Zellkern (Abb. 14B). GFP alleine, zeigt aufgrund seiner Diffusionsfähigkeit eine homogene Verteilung im Kern wie im Zytoplasma der Zelle, welche auf eine Behandlung mit LMB nicht anspricht (Abb. 14E und 14H). Vormalig zytoplasmatisch lokalisiertes Survivin_{WT}-GFP, akkumuliert nach LMB-Inkubation im Zellkern (Abb. 14D und 14G). Da hier allerdings die passive Diffusion dem aktiven Export entgegenwirkt, kommt es nur zu einer teilweisen Verlagerung des Proteins vom Zytoplasma in den Kern. Die

Ergebnisse können also als erster Hinweis darauf gewertet werden, dass in der Proteinsequenz von XIAP, möglicherweise ein LMB-sensitives Exportsignal vorhanden ist.

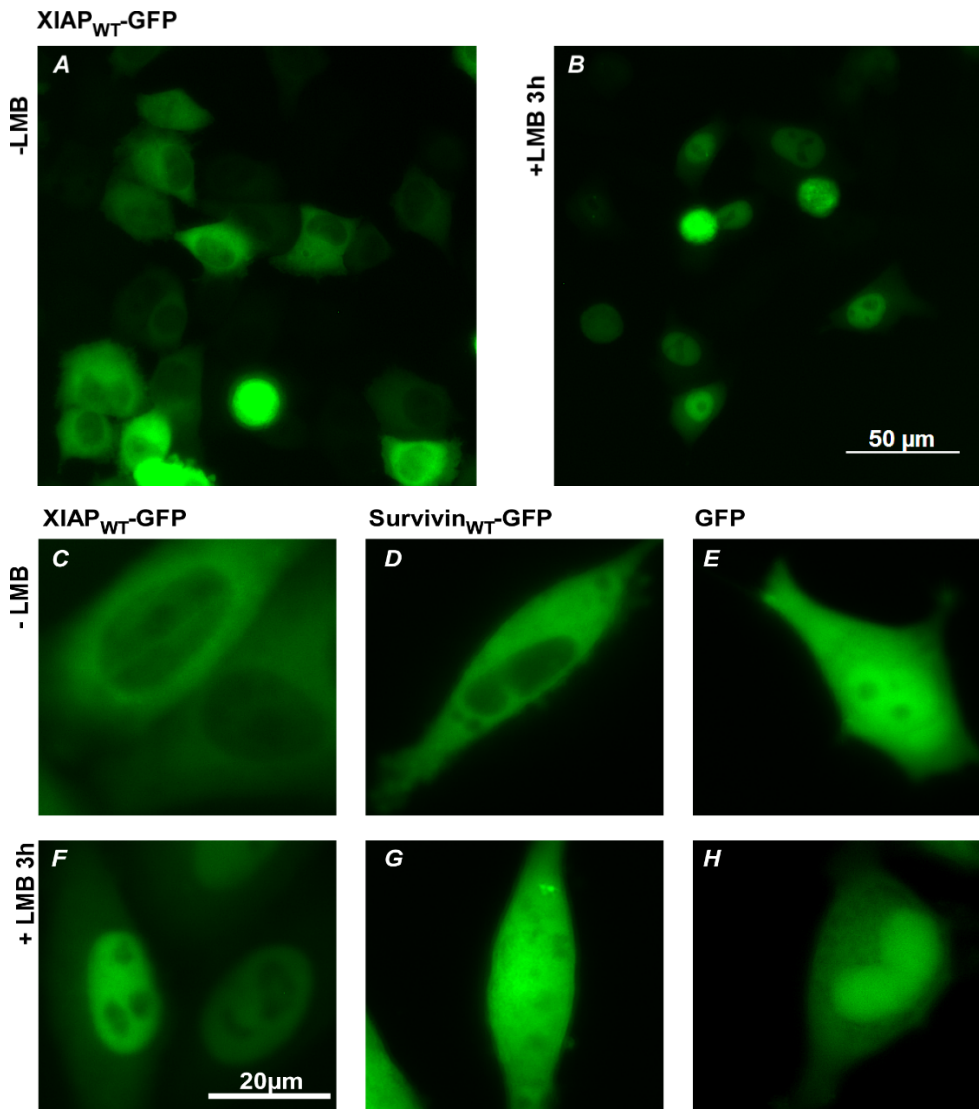


Abb. 14 – Lokalisationsanalyse von XIAP_{WT}-GFP nach Exportinhibition

LMB beeinflusst die Lokalisation von XIAP_{WT}-GFP. XIAP_{WT}-GFP wurde in HeLa-Zellen transient für 24 h überexprimiert und anschließend drei Stunden mit LMB (10 nM) behandelt (A/B und C/F). Die Zellen wurden vor und nach der LMB-Behandlung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. GFP (E/H) wurde als Negativ- und Survivin (D/G) als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind einerseits ein Übersichtsbild bei einer Vergrößerung von 20x (A/B) und andererseits detaillierte Aufnahmen der Zellen bei einer Vergrößerung von 40x (C-H). Maßstabsbalken, 50 µm (A/B), bzw. 20 µm (C-H). Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.1.2 Expression des Apoptose-Inhibitorproteins XIAP

Im nächsten Schritt ist nun zu klären, wo endogenes XIAP in der Zelle lokalisiert und wie es auf LMB reagiert. Hierzu wurden zunächst verschiedene Zelllinien hinsichtlich ihrer endogenen XIAP-Expression analysiert, um so deren Eignung für weitere Experimente zu überprüfen. Hierzu wurden die Zellen lysiert und per SDS-PAGE und Western-Blot auf die XIAP-Expression hin untersucht. So konnte in den Zelllinien 293T, Hela und SK-Mel37 die größte Menge an endogenem XIAP nachgewiesen werden. In A431-Zellen, welche Survivin_{WT}-GFP stabil exprimieren, ist die XIAP-Menge gegenüber parental A431-Zellen ebenfalls geringfügig erhöht. NW-450 und Vero-Zellen weisen nur eine sehr geringe XIAP-Expression auf (Abb. 15). Aufgrund dieser Ergebnisse sowie bestehender experimenteller Erfahrungen, insbesondere hinsichtlich der Immuncytochemie, wurden für die folgenden Experimente Hela-Zellen verwendet.

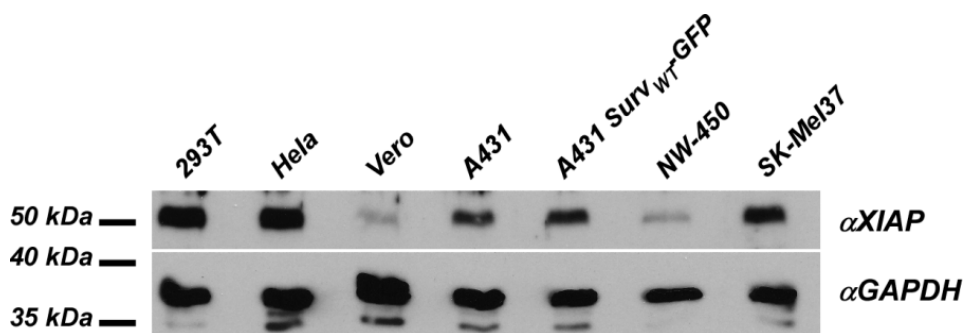


Abb. 15 – Expression von endogenem XIAP in unterschiedlichen Zelllinien

Gesamtzelllysate verschiedener Zelllinien wurden per Western-Blot auf die Expression von endogenem XIAP hin untersucht. GAPDH diente als Ladekontrolle. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.1.3 Lokalisationsanalyse von endogenem XIAP

Um den Einfluss der Exportinhibition durch LMB auf endogenes XIAP in Hela-Zellen zu untersuchen, wurden diese mittels indirekter Immuncytochemie analysiert. Da zunächst kein immuncytochemisches Färbeprotokoll für den zu verwendenden XIAP Antikörper (Tab. 13) existierte, wurde die Färbung zunächst mit und ohne vorherige Permeabilisierung mit 0,1% Triton X-100/ PBS durchgeführt (Abb. 16). In beiden Fällen konnte kein Unterschied vor und nach LMB-Behandlung (10 nM) festgestellt werden. Allerdings zeigte der verwendete Antikörper ohne Permeabilisierung eine rein zytoplasmatische (Abb. 16H und 16K), nach Triton-Behandlung eine nukleäre Färbung (Abb. 16B und 16E).

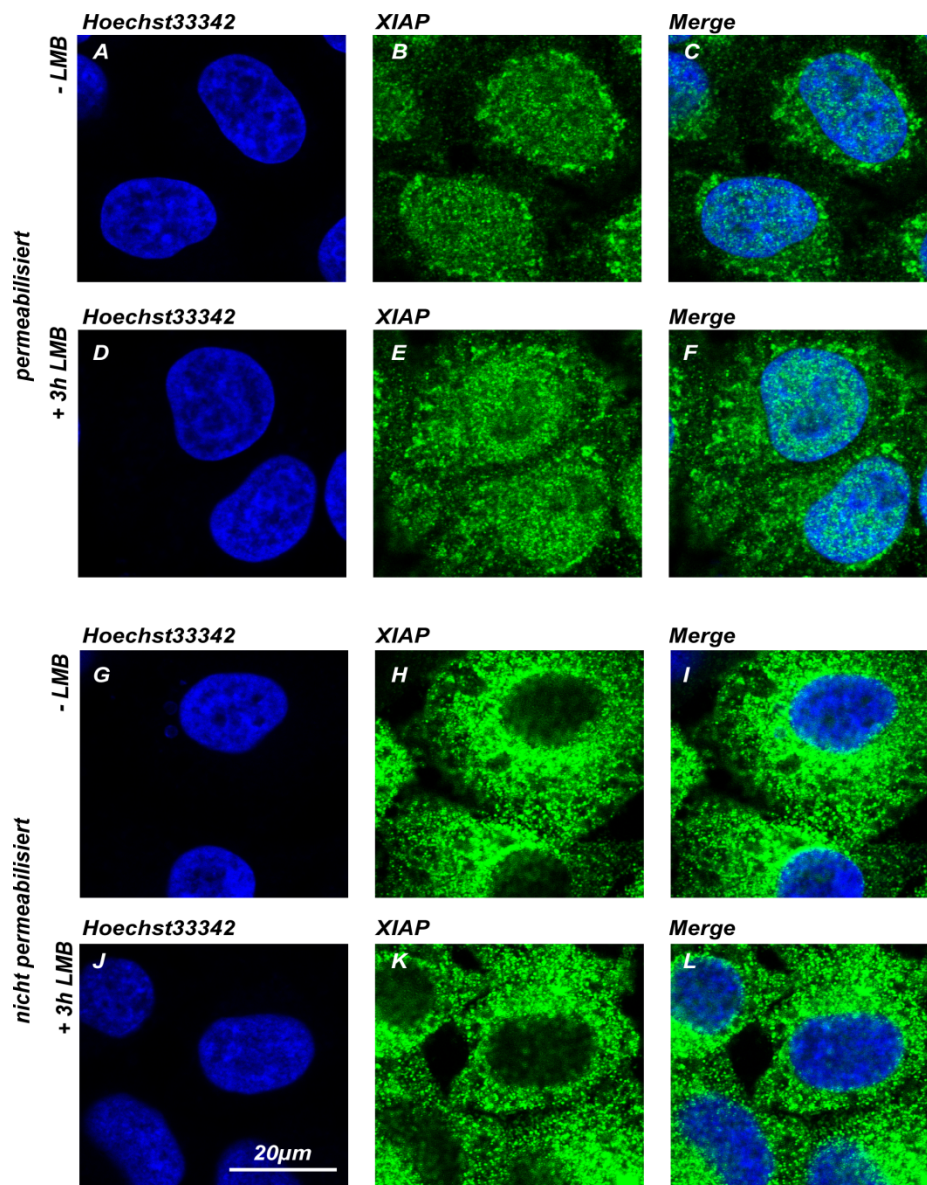


Abb. 16 – Lokalisationsanalyse von endogenem XIAP nach Export-Inhibition

Hela-Zellen wurden mit LMB (10 nM) behandelt und anschließend fixiert. Danach wurden die Zellen mit XIAP-spezifischem Antikörper gefärbt. Zur Optimierung des Färbeprotokolls wurde ein Ansatz direkt gefärbt (A-F) und der andere zusätzlich permeabilisiert (G-L). Es konnte kein Einfluss von LMB auf die endogene Lokalisation von XIAP nachgewiesen werden, da XIAP entweder nur im Kern (A-F) oder dem Zytoplasma (G-L) angefärbt wurde. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 angefärbt. Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.1.4 Zelluläre Fraktionierung vor und nach LMB-Behandlung

Mittels zellulärer Fraktionierung, sollten die Ergebnisse der mikroskopischen Studien nun auch biochemisch verifiziert werden. Dazu wurden untransfizierte und mit XIAP_{WT}-GFP transfizierte 293T-Zellen 24 h nach der Transfektion einer Zellfraktionierung unterzogen (Abb. 14).

Die getrennte Analyse der Zellkompartimente zeigt sowohl für endogenes XIAP als auch für transient überexprimiertes XIAP_{WT}-GFP eine signifikante Akkumulation von XIAP in der Kernfraktion nach LMB-Behandlung. Parallel dazu ist eine Abnahme der XIAP-Menge im Zytoplasma zu erkennen. Lamin und GAPDH dienten der Qualitätskontrolle der Fraktionierung. Dies bestätigte die nach LMB-Behandlung nachgewiesene nukleäre Lokalisation von XIAP (Abb. 17A und 17B).

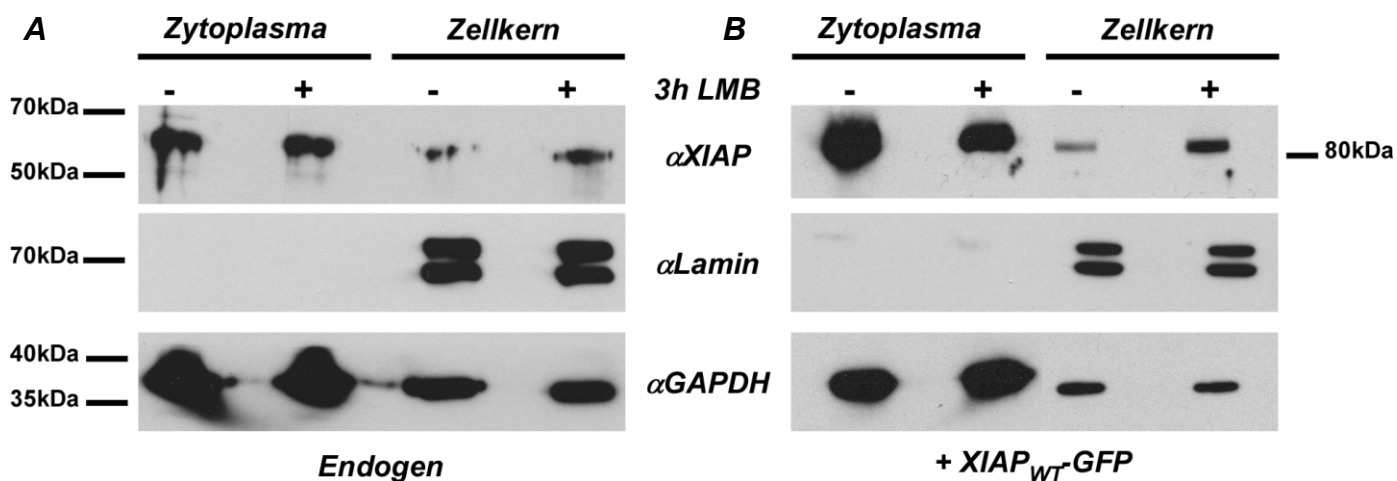


Abb. 17 –XIAP akkumuliert nach LMB-Behandlung im Zellkern

Western-Blot-Analyse fraktionierter Zelllysate von untransfizierten (A) und mit XIAP_{WT}-GFP transfizierten (B) 293T-Zellen, ohne und mit LMB (10 nM). Lamin (nukleär) und GAPDH (zytoplasmatisch) dienten als Fraktionierungs-Kontrolle. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.1.5 Interaktion von XIAP und dem Exportrezeptor Crm1

Da der Transportrezeptor Crm1, welcher direkt durch LMB-gehemmt wird, eine zentrale Rolle in der Vermittlung des Exports von Proteinen aus dem Zellkern ins Zytoplasma einnimmt, sollte im Folgenden untersucht werden, ob dieser auch mit XIAP interagiert. Aus diesem Grund wurde XIAP_{WT}-GFP zunächst mit Crm1-Myc kotransfiziert und die Lokalisation nach 24 h fluoreszenzmikroskopisch visualisiert.

Wird XIAP_{WT}-GFP alleine transfiziert, lokalisiert es wie bereits beschrieben hauptsächlich im Zytoplasma und teils im Kern der Zelle (Abb. 18A). Wird Crm1-Myc mit XIAP_{WT}-GFP kotransfiziert, verringert sich die Menge an XIAP im Zellkern signifikant (Abb. 18B).

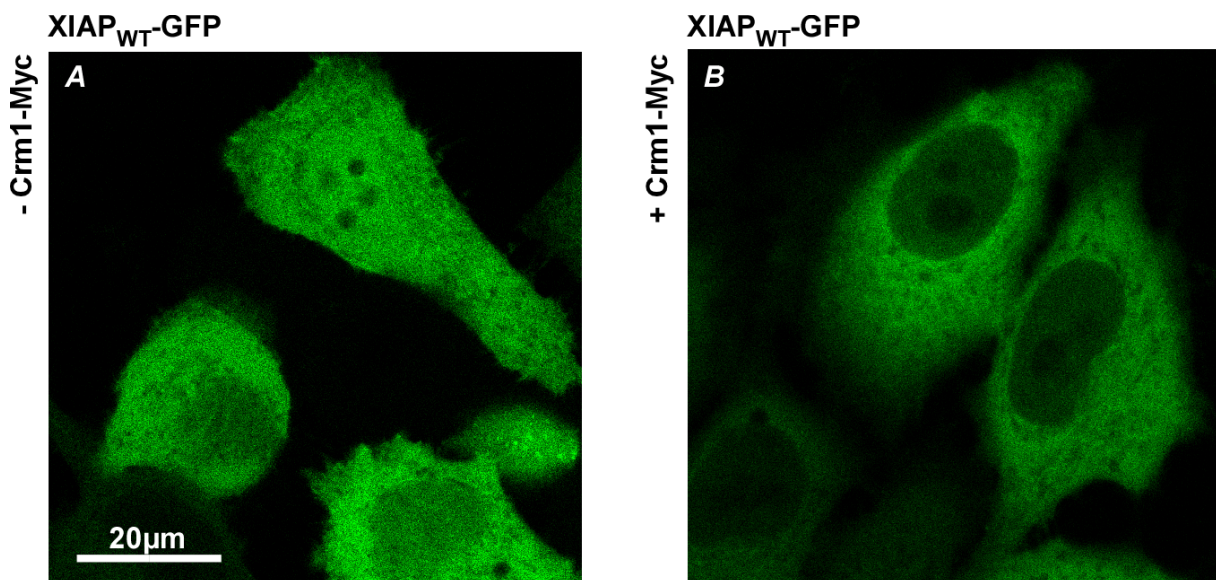


Abb. 18 – Die Ko-Expression des Exportrezeptors Crm1 beeinflusst die Lokalisation von XIAP

Hela-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und 24 h nach Transfektion fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Einzeltransfektion von XIAP_{WT}-GFP (A). Kotransfektion von XIAP_{WT}-GFP und Crm1-Myc (B). Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.1.6 Interaktionsanalyse von XIAP und dem Exportrezeptor Crm1

Zur biochemischen Verifizierung der aus der Kotransfektion von XIAP und Crm1 gewonnenen Ergebnisse (Abb. 18), wurde eine Ko-Immunpräzipitation zur Analyse der Proteininteraktion im Zelllysat durchgeführt. Diese erlaubt die biochemische Analyse einer Proteininteraktion *in vivo*. Die Interaktionspartner XIAP_{WT}-GFP und Crm1-Myc wurden kotransfiziert und mittels eines gegen GFP gerichteten Antikörpers präzipitiert. Die Detektion erfolgte über einen α -Myc-Antikörper. Es zeigte sich, dass Crm1 (116 kDa) im Input (Abb. 19 links) vorhanden ist, in der IP jedoch nur mit XIAP_{WT}-GFP kopräzipitiert wird, nicht aber mit den Negativkontrollen (Abb. 19 rechts).

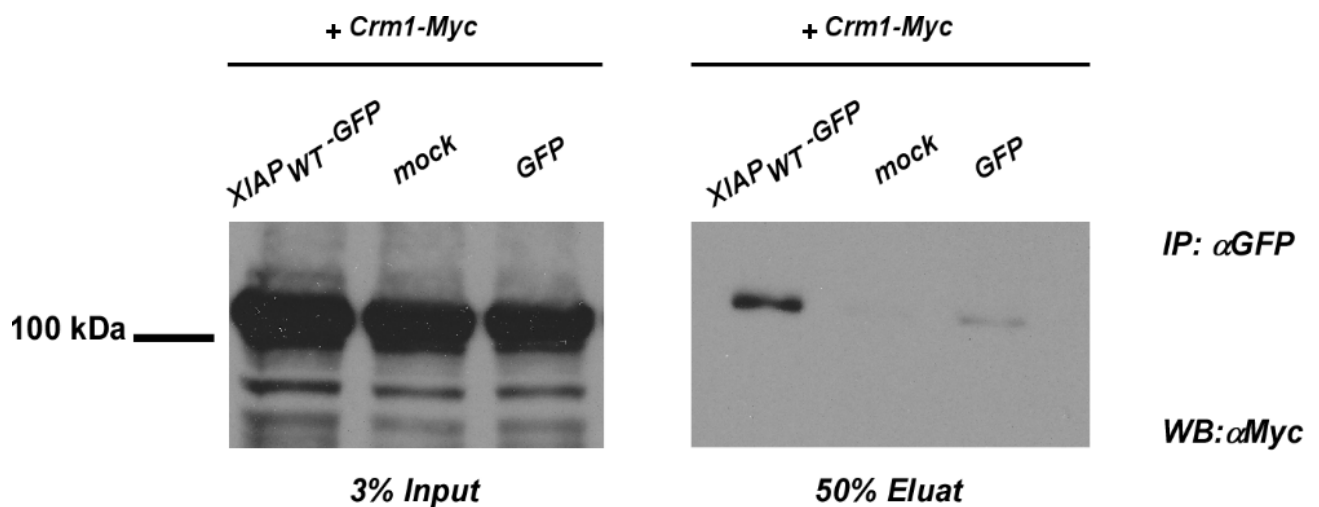


Abb. 19 – XIAP und Crm1 zeigen Hinweis auf Interaktion nach Ko-IP

Western-Blot-Analyse der Ko-Immunpräzipitation aus Gesamtzelllysaten von 293T-Zellen, welche mit den angegebenen Plasmiden transfiziert wurden. Als Negativkontrollen dienten ein pc-DNA3.1-Leervektor (mock) und GFP. Die linke Seite zeigt 3 % des Inputs, die rechte 50 % des Eluats. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.2 Eingrenzung eines möglichen nukleären Exportsignals in XIAP

Da die Kombination der vorherigen Ergebnisse auf die Existenz eines möglichen Exportsignals (NES) hindeutet, wurden *in silico*-Sequenzanalysen und weiterführende Versuche zu dessen Eingrenzung und Verifizierung durchgeführt.

3.1.2.1 *In silico*-Sequenzanalyse von XIAP

Um die genaue Position des möglichen nukleären Exportsignals (NES) zu verifizieren, wurde die komplette Proteinsequenz von XIAP mit Hilfe unterschiedlicher online verfügbarer bioinformatischer Algorithmen auf potenzielle NES analysiert. Diese umfassende Analyse prognostiziert mehrere verschiedene Sequenzbereiche, welche den bekannten Konsensussequenzen für Kernexportsignale entsprechen (Abb. 20). Für die weiteren Experimente wurde die Aminosäuresequenz von XIAP nun in fünf Abschnitte unterteilt, die jeweils eines der potenziellen Exportsignale tragen sollten. Diese wurden durch Unterstriche kenntlich gemacht (Abb. 20).

Zudem wurde beschrieben, dass XIAP von den Caspasen-3 und -7 in zwei Teilstücke gespalten werden kann (Quinn L. Deveraux 1999). Aus diesem Grund wurde XIAP zusätzlich in das sog. N-terminale und C-terminale Fragment aufgeteilt (Abb. 20). So sollte im Folgenden das Exportsignal genauer lokalisiert werden können und analysiert werden, ob die Spaltung durch die genannten Caspasen möglicherweise die Translokation von XIAP zu beeinflussen vermag.

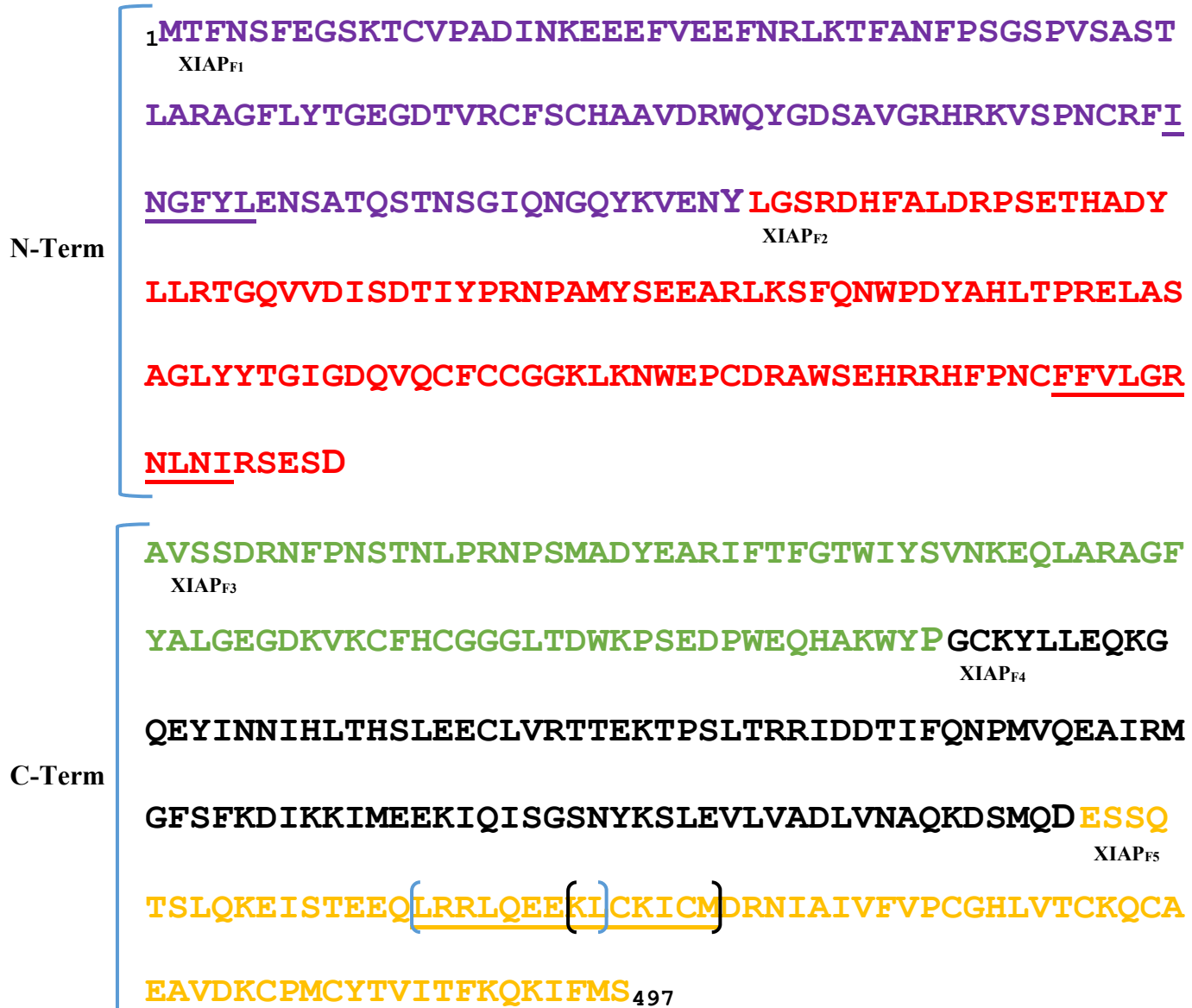


Abb. 20 – *In silico*-Sequenzanalyse hinsichtlich potenzieller Exportsignale in XIAP

In der Übersicht ist die komplette XIAP Proteinsequenz dargestellt. Die unterstrichenen Abschnitte heben die über biologische Algorithmen vorhergesagten NES in XIAP hervor. Die verschiedenen Farben markieren die fünf Teilsequenzen, welche experimentell verwendet werden sollen, um die genaue Position des potenziellen Kernexportsignals zu verifizieren. Drei der Teilsequenzen beinhaltet je ein vorhergesagtes Kernexportsignal, wobei XIAP_{F5} sogar drei enthält, durch die blaue und schwarze Klammer gekennzeichnet. Die blauen Klammern markieren jeweils den N- bzw. C-terminalen Bereich, der nach Caspase-3/-7 Spaltung entsteht.

3.1.2.2 XIAP-Konstrukte zur Verifizierung des Exportsignals

Die einzelnen Fragmente von XIAP wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) kloniert und jeweils einmal mit einem C-terminalen GFP-Marker und einmal mit einem zusätzlichen N-terminalen GST-Marker versehen (Abb. 21). Der GST-Marker soll bei weiteren transienten Transfektionen und folgender LMB-Behandlung die passive Diffusion der kurzen Teilstücke verhindern.

Im Weiteren wurden die rekombinanten XIAP_{F1-F5}/ XIAP_{N-Term}-C-Term- DNA-Sequenzen in den prokaryontischen Expressionvektor pGEX-GST-GFP (Tab. 11) kloniert. So konnten im Anschluss die rekombinanten XIAP_{F1-F5} Proteine in *E.coli* BL21-Bakterien exprimiert, über den GST-Marker aufgereinigt und schließlich für Mikroinjektionsexperimente verwendet werden. Die Fusion mit GFP dient dabei der visuellen Detektion der Proteine und deren Translokation bzw. Lokalisation in der Zelle. Eine Übersicht über die hergestellten Konstrukte einschließlich der bislang dokumentierten Domänenorganisation des Proteins ist in Abbildung 21 gezeigt.

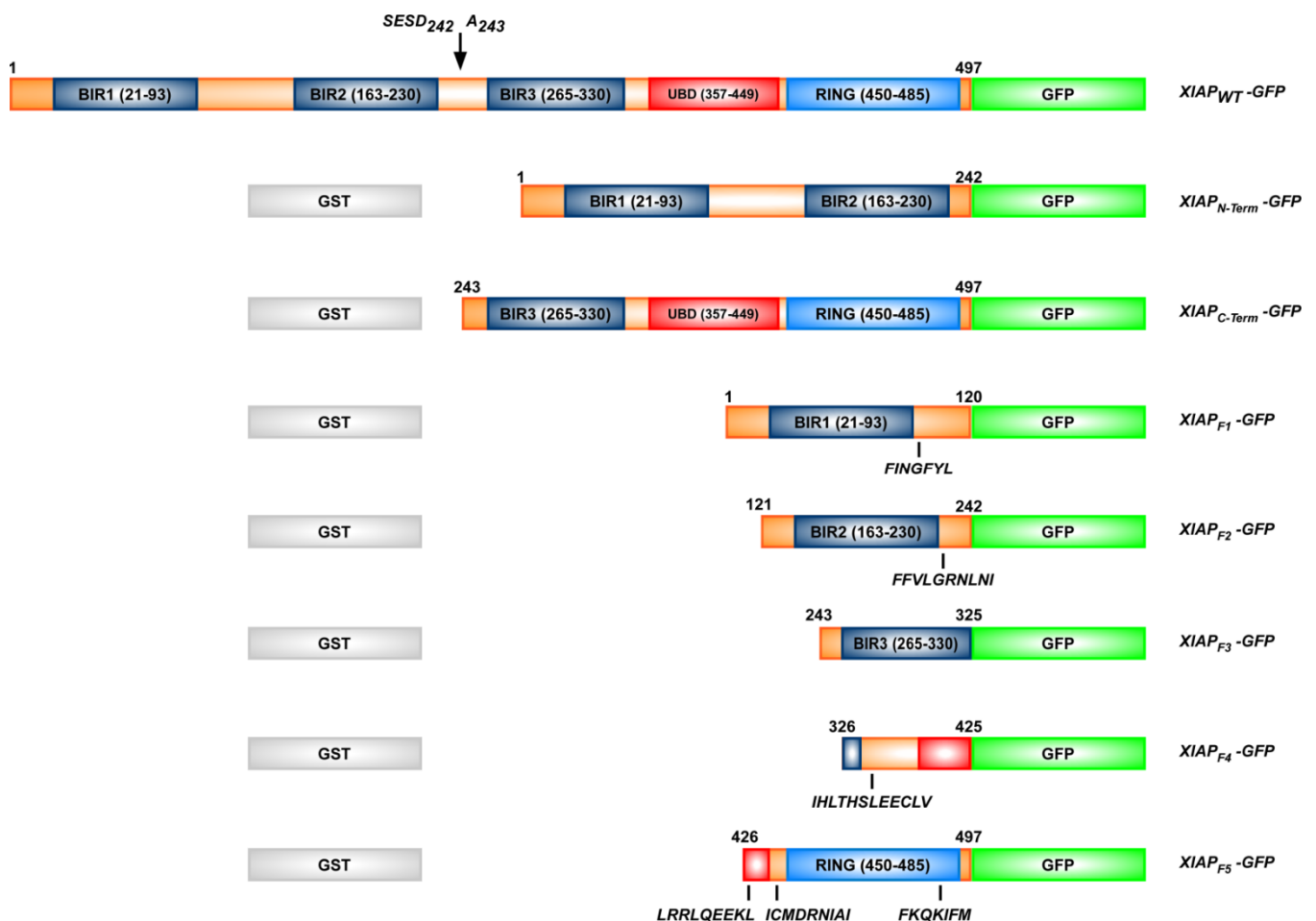


Abb. 21 – Schematische Darstellung der XIAP-Expressions-Konstrukte

Die XIAP-Teilsequenzen wurden zum einen mit einem C-terminalen GFP-Tag (grün) und zum anderen mit einem zusätzlich eingebrachten N-terminalen GST-Tag (grau) fusioniert. In dunkelblau sind die einzelnen BIR- (*Baculovirus IAP-Repeat*) und in hellblau die RING- (*Really Interesting New Gene*) Domänen gekennzeichnet. Die UBA (*Ubiquitin-Associated-Binding-Domain*) ist in Rot hervorgehoben, die jeweiligen Aminosäure-Positionen finden sich in Klammern. Unterhalb der Konstrukte F1-F5, sind die Positionen der möglichen Exportsignale und deren Aminosäuresequenzen angegeben.

3.1.2.3 Lokalisationsanalyse der N- / C-terminalen XIAP-GFP Konstrukte

Das N- und C-terminale XIAP-GFP-Konstrukt (Abb. 21) wurde in Hela-Zellen für 24 h transient überexprimiert und die Zellen anschließend mit LMB (10 nM) behandelt. Die mit GFP fusionierten Proteine lokalisieren zunächst primär im Kern, aber auch zu einem geringen Anteil im Zytoplasma (Abb. 22A und 22B). Diese zelluläre Verteilung ändert sich auch nach dreistündiger Inkubation mit LMB (10 nM) nicht (Abb. 22C und 22D).

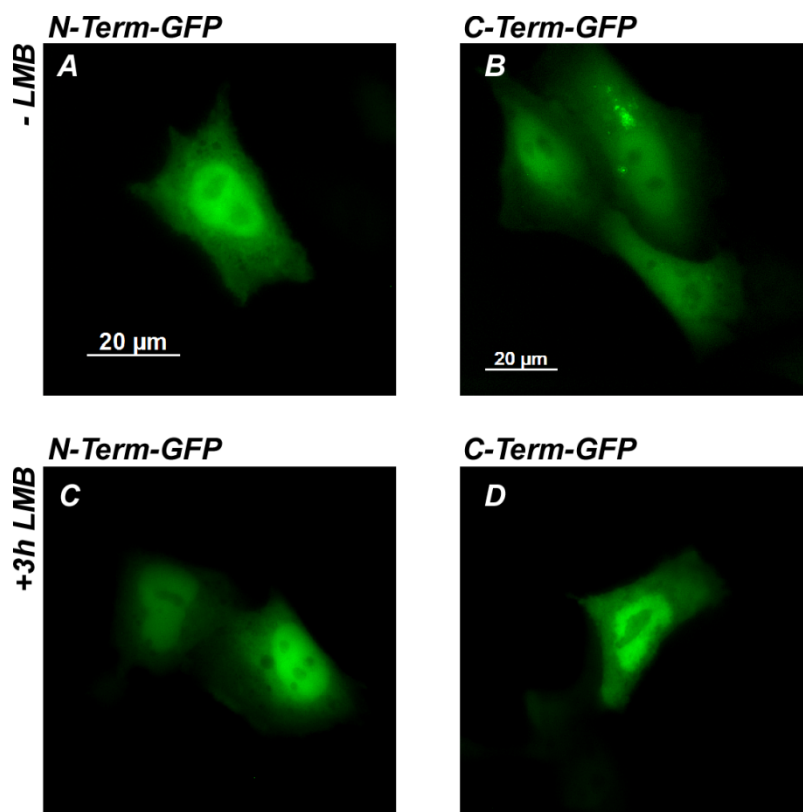


Abb. 22 – Export-Inhibition beeinflusst weder die Lokalisation des N- noch des C-terminalen XIAP-Konstruktes

Hela-Zellen wurden transient mit dem N- und C-terminalen XIAP mit GFP Fusionskonstrukten transfiziert und mit LMB (10 nM) behandelt. Die Zellen wurden vor und nach der Behandlung unfixiert unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Weder das N- (A/C) noch das C-terminale (B/D) Konstrukt zeigt eine Reaktion auf LMB. Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.2.4 Lokalisationsanalyse der N- / C-terminalen GST-XIAP-GFP Konstrukte

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob ein zusätzlicher GST-Tag am N-Terminus der XIAP-Fragmente deren Lokalisation beeinflusst. Mit einem Molekulargewicht von knapp 30 kDa und seiner sterischen Beschaffenheit kann GST die Kernpore nicht überwinden und kann in Fusion mit anderen Proteinen deren passive Diffusion verhindern. So wurden die entsprechenden Fragmente, GST-XIAP_{N-Term}-GFP und GST-XIAP_{C-Term}-GFP hergestellt, ebenfalls für 24 h transient in Hela-Zellen überexprimiert und 3 h mit LMB (10 nM) inkubiert. In Abwesenheit von LMB lokalisieren beide Proteine ausschließlich im Zytoplasma (Abb. 23A und 23B). Nach LMB-Behandlung akkumuliert GST-XIAP_{N-Term}-GFP im Kern der Zellen (Abb. 23C), wohingegen die Lokalisation von GST-XIAP_{C-Term}-GFP unverändert bleibt (Abb. 23D).

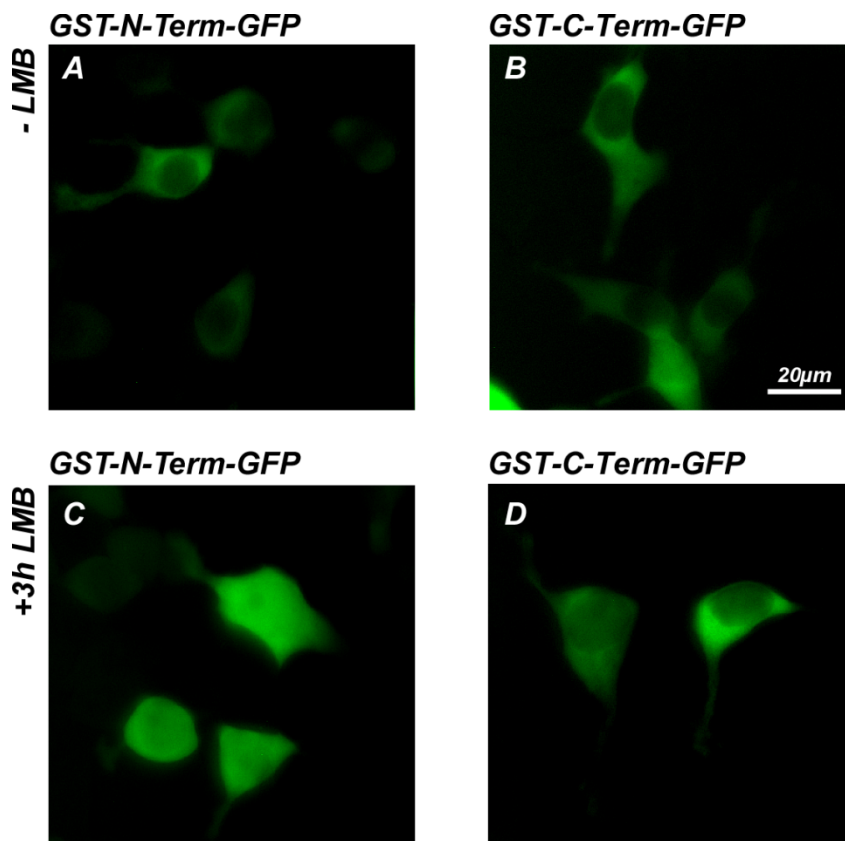


Abb. 23 – GST-XIAP_{N-Term}-GFP akkumuliert nach LMB-Behandlung im Zellkern

Hela-Zellen wurden transient mit GST-XIAP_{N-Term}-GFP und GST-XIAP_{C-Term}-GFP transfiziert und mit LMB (10 nM) behandelt. Die Zellen wurden vor und nach der Behandlung unfixiert fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Im Vergleich zum C-terminalen Konstrukt (B/D) zeigt der N-Terminus von XIAP (A/C) nach LMB-Behandlung eine nukleäre Akkumulation. Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.2.5 Lokalisationsanalyse der XIAP-GFP Konstrukte F1-F5

Um nun die Position des potenziellen Exportsignals weiter verifizieren zu können, wurden im Folgenden die fünf vorab beschriebenen XIAP-GFP Konstrukte (Abb. 21) für 24 h transient in Hela-Zellen überexprimiert und anschließend drei Stunden lang mit LMB (10 nM) behandelt. Alle transfizierten Konstrukte lokalisieren ohne Zugabe von LMB in der gesamten Zelle, zeigen aber dabei eine etwas stärkere Kernlokalisierung (Abb. 24A - 24E). Nach LMB-Inkubation ist kein signifikanter Unterschied in der Lokalisation der Fusionsproteine zu erkennen (Abb. 24F - 24J).

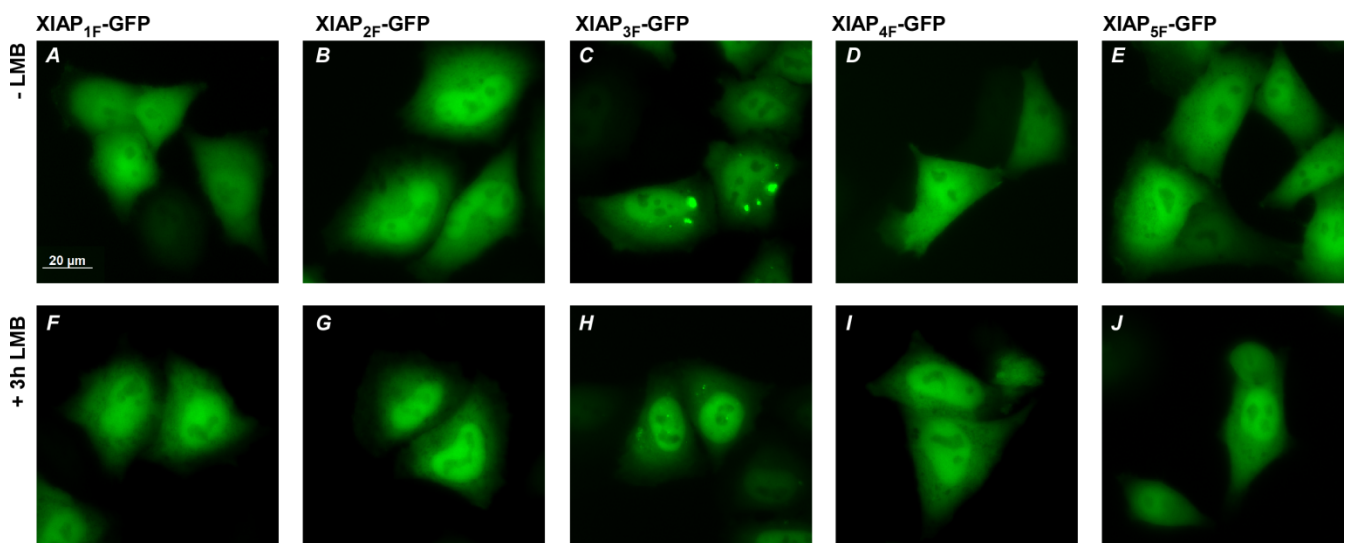


Abb. 24 – Export-Inhibition hat keinen Einfluss auf die Lokalisation der GFP-markierten Deletionskonstrukte XIAP_{F1-F5}

Hela-Zellen wurden mit den jeweiligen XIAP-GFP Fragmenten 1-5 transient transfiziert und mit LMB (10 nM) behandelt. Die Zellen wurden vor (A-E) und nach (F-J) der LMB-Behandlung unfixiert fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Keines der Konstrukte zeigt nach der Inkubation mit LMB eine Lokalisationsveränderung. Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.2.6 Lokalisationsanalyse der GST-XIAP-GFP Konstrukte F1-F5

Nachdem keines der XIAP_{F1-F5}-GFP Fusionsproteine eine Reaktion auf die LMB-Behandlung zeigte und somit keine eindeutige Aussage über die Position des nukleären Exportsignals getroffen werden kann, wurde der Versuch mit den GST-XIAP_{F1-F5}-GFP Konstrukten wiederholt. Das zusätzliche N-terminale GST-tag sollte eine mögliche passive Diffusion der Proteine verhindern. Für diesen Versuch wurden 293T-Zellen verwendet. 24 Stunden nach Transfektion sind die Konstrukte primär im Zytoplasma und nur sehr schwach im Kern der Zellen exprimiert (25A - 25E). Eine anschließende dreistündige Behandlung der transfizierten Zellen mit LMB (10 nM) induziert keine Umlagerung der GST-XIAP_{F1-F5}-GFP Proteine, sie lokalisieren weiterhin zytoplasmatisch (Abb. 25F - 25J).

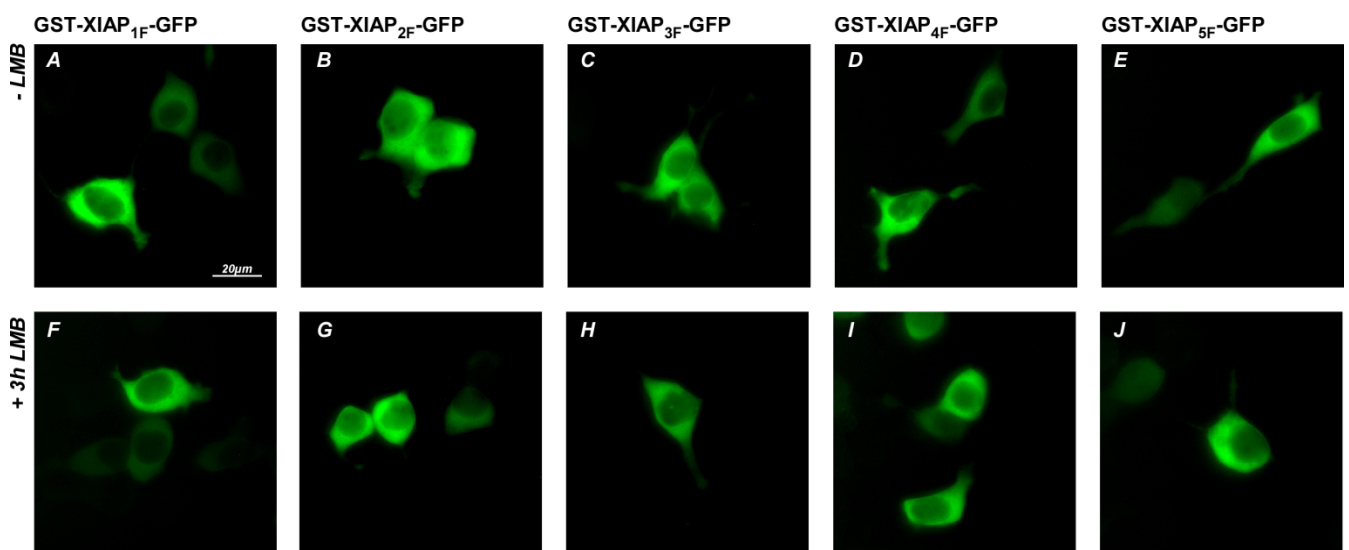


Abb. 25 – Exportinhibition hat keinen Einfluss auf die Lokalisation der GFP-markierten GST-GFP fusionierten XIAP-Deletionskonstrukte F1-F5

293T-Zellen wurden mit den jeweiligen GST-XIAP-GFP Fragmenten 1-5 transient transfiziert und 24 h später, mit LMB (10 nM) behandelt. Die Zellen wurden vor (A-E) und nach (F-J) der LMB-Behandlung unfixiert fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Keines der Konstrukte zeigt nach der Inkubation mit LMB eine Lokalisationsveränderung. Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.2.7 Bakterielle Expression der GST-XIAP-GFP Konstrukte F1-F5

Die computergestützte Mikroinjektion eröffnet die Möglichkeit, Proteine präzise in Zellkompartimente wie den Kern oder das Zytoplasma einzubringen und deren Translokation in der Zelle direkt zu visualisieren. So sollte eine mögliche Translokation der GST-XIAP_{F1-F5}-GFP-Konstrukte mittels dieser Methode untersucht werden. Hierzu wurden die Konstrukte in den prokaryontischen Expressionsvektor pGex-GST-GFP umklontiert und anschließend in *E.coli* BL21 transformiert. Die Proteinexpression wurde mit IPTG (1 mM) induziert (s. 2.2.3.10). Um die Qualität der Proteinexpression zu dokumentieren wurden vor (v.l.) und nach der IPTG-Induktion (n.l.) sowie nach der *Bead*-Inkubation und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. In Abbildung 26, ist auf dem Coomassie gefärbten SDS-Gel zu erkennen, dass alle Proteine nach Induktion in hohen Mengen exprimiert werden. Nach der *Bead*-Inkubation nahm die Menge des Proteins im Überstand (Ü.B.) im Vergleich zur n.l. Probe ab. Es genügen bereits kleinste Mengen an IPTG (0,3 mM), um die Proteine adäquat zu exprimieren (Abb. 26/ XIAP_{5F}). Somit konnten die Proteine zur Mikroinjektion aufgereinigt werden.

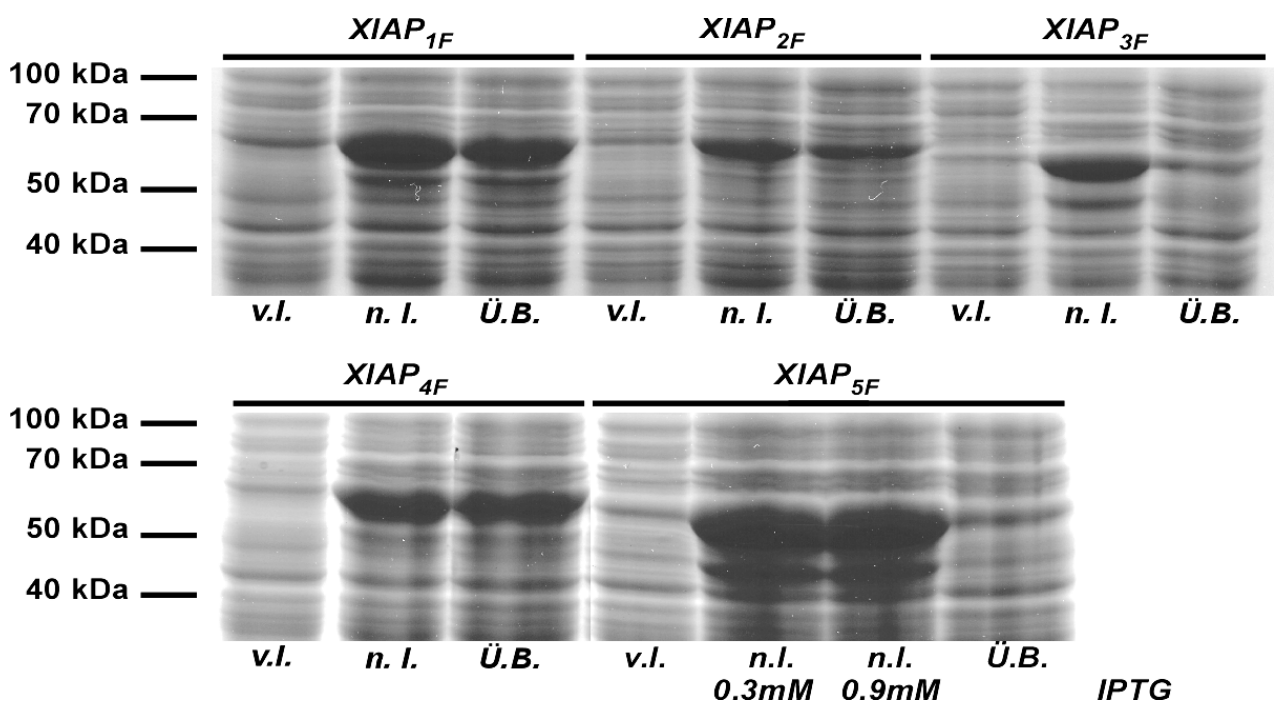


Abb. 26 – Bakterielle Expression der GST-XIAP-GFP Konstrukte 1-5 in *E.coli* BL21

Alle Konstrukte konnten in ausreichende Menge exprimiert werden. Sowohl vor (v.l.) und nach (n.l.) der IPTG-Induktion (1 mM), der Proteinexpression in den *E.coli* BL21-Bakterien als auch nach der Kopplung der Proteine an die *Beads* wurde je 1 ml zur Analyse in einem SDS-Gel abgenommen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

3.1.2.8 Mikroinjektionen

Die bakteriell exprimierten und aufgereinigten GST-XIAP_{F1-F5}-GFP Proteine wurden einzeln zur Mikroinjektion eingesetzt (s. 2.2.5). Die Proteine wurden einzeln in die Kerne von Vero-Zellen injiziert und über einen Zeitraum von 20 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet (Abb. 27A, E, I und H). GST-XIAP_{F1}-GFP zeigt bereits nach drei Stunden eine geringe Translokation aus dem Kern ins Zytoplasma (Abb. 27B). Nach drei weiteren Stunden ist zu erkennen, dass die Translokation weiter voranschreitet und nach 20 Stunden eine ausgeglichene Verteilung im Zellkern und dem Zytoplasma vorliegt (Abb. 27C und 27D). Ebenso transloziert GST-XIAP_{F2}-GFP bereits nach drei Stunden (Abb. 27F). Die Intensität ist vergleichbar mit der des GST-XIAP_{F1}-GFP Proteins (vgl. Abb. 27B). Im weiteren Verlauf nimmt die Proteinmenge im Kern weiter ab und im Zytoplasma soweit zu, dass auch hier nach 20 Stunden ein Gleichgewicht in der Verteilung erreicht ist (Abb. 27H und 27I). Da es zu Komplikationen bei der Protein-Aufreinigung des GST-XIAP_{F3}-GFP-Konstruktes kam, wurde dieses Protein nicht mikroinjiziert und ist somit in seiner möglichen Exportfunktion, nicht zu bewerten.

GST-XIAP_{F4}-GFP ist auch drei Stunden nach Injektion ausschließlich im Zellkern zu detektieren und lässt keine Translokation erkennen (Abb. 27J). Nach sechs Stunden hingegen ist das Protein in geringem Maß im Zytoplasma vorhanden. Nach weiteren 17 Stunden ist im Kern und dem Zytoplasma eine Gleichverteilung des Proteins detektierbar (Abb. 27K und 27L). Im Vergleich zu den Konstrukten XIAP_{F1} und XIAP_{F2} ist die Proteinverteilung zwischen dem Kern und Zytoplasma homogener (Abb. 27L). GST-XIAP_{F5}-GFP lässt nach drei Stunden eine geringe Umlagerung erkennen (Abb. 27N), die im Verlauf der Zeit nicht weiter zunimmt (Abb. 27N - 27P).

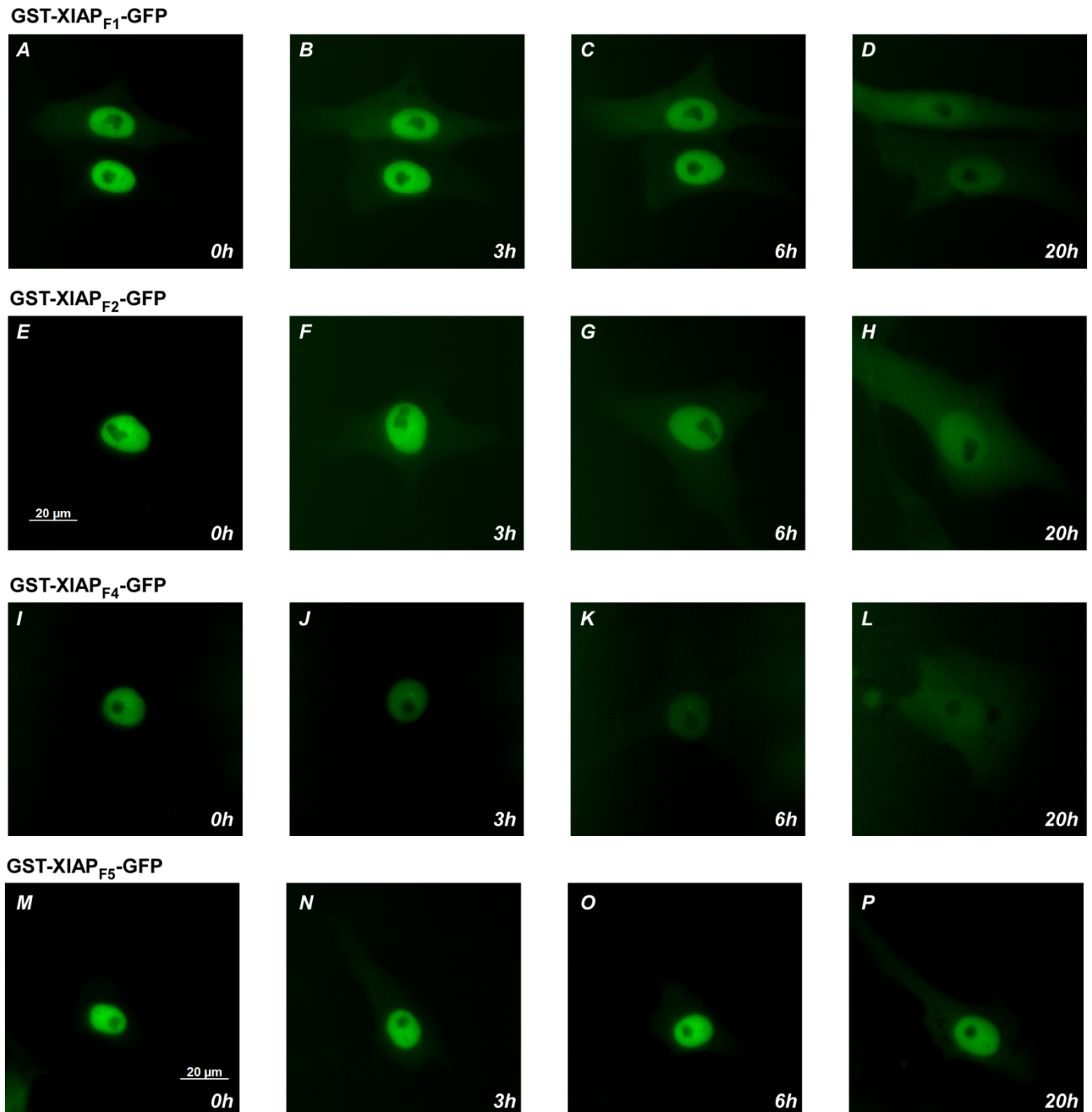


Abb. 27 – Exportaktivität der GST-XIAP-GFP-Deletionskonstrukte F1, F2 und F4 nach Mikroinjektion

Zeitkinetik der Translokation rekombinanter GST-GFP-Fusionsproteine, welche die definierten XIAP-Sequenzabschnitte beinhalten, nach Mikroinjektion in den Kern von Vero-Zellen. Die injizierten GST-XIAP-GFP Konstrukte 1 (A-D), 2 (E-H), 4 (I-L) und 5 (M-P) wurden nach der Injektion über einen Zeitraum von 20 h unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Bis auf GST-XIAP_{F5}-GFP zeigen alle Konstrukte eine Translokation nach 20 h. Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.2.9 Interaktionsanalyse der XIAP-GFP Konstrukte F1-F5 mit Crm1

Basierend auf den Ergebnissen der Mikroinjektion, wurden die entsprechenden XIAP-Deletionskonstrukte anschließend in der Ko-Immunpräzipitation auf eine mögliche Interaktion mit dem Exportrezeptor Crm1 hin untersucht. Das F3-Fragment wurde trotz der nicht erfolgreichen Mikroinjektion ebenfalls in die Analyse eingeschlossen. 293T-Zellen wurden mit Crm1-Myc und den angegebenen Plasmiden kotransfiziert, 24 h später wurde ein Gesamt-Zelllysat hergestellt und dieses mittels α -GFP Antikörper präzipitiert. Sowohl der Input (Abb. 28 links) als auch das Eluat (Abb. 28 rechts) der IP wurde mittels Western-Blot mit α -GFP und α -Myc Antikörpern analysiert. Im Input konnten alle überexprimierten Proteine detektiert werden und auch im Eluat waren die präzipitierten GFP-Fusionsproteine ausnahmslos nachzuweisen.

In der Tat konnte mit den die GFP-markierten XIAP-Fragmente 1, 2 und 4 sowie in geringem Maße auch mit Fragment 5 Crm1-Myc vergleichbar mit der Survivin_{WT}-GFP-Positivkontrolle kopräzipitiert werden. XIAP_{F3}-GFP zeigte eine der GFP-Negativkontrolle ähnliche, kaum nachweisbare Kopräzipitation (Abb. 28 rechts).

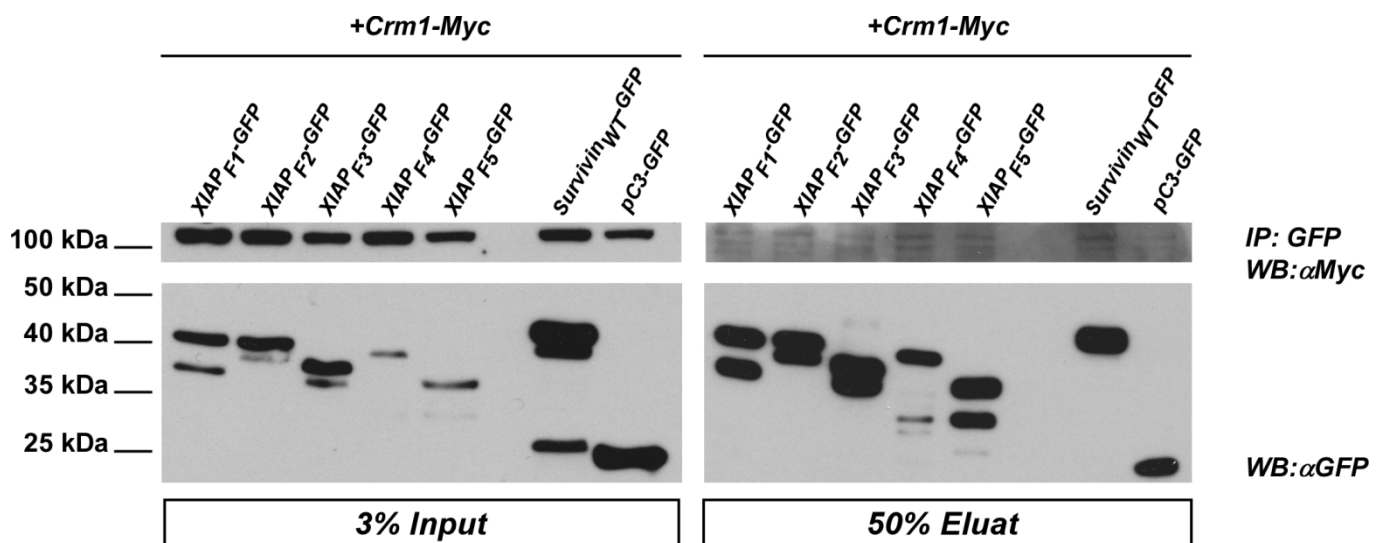


Abb. 28 – Die XIAP-GFP-Deletionskonstrukte F1, F2 und F4 interagieren mit Crm1

Ko-Immunpräzipitation von Gesamtzelllysaten von 293T-Zellen, welche mit den angegebenen Plasmiden transfiziert wurden. Als Positivkontrolle diente Survivin_{WT}-GFP und als Negativkontrolle pC3-GFP. Zur Präzipitation wurde ein α -GFP Antikörper verwendet und für die Western-Blot-Detektion ein α -GFP- und α -Myc-Antikörper. Die linke Seite zeigt 3 % des Inputs, die rechte 50 % des Eluates. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.3 Funktionsanalyse von XIAP und dessen Interaktionspartnern

Exportinhibitions-Versuche konnten zeigen, dass die subzelluläre Lokalisation von XIAP durch LMB beeinflusst wird. Dennoch können nach der Sequenzanalyse und experimenteller Verifizierung keine signifikanten Aussagen über die genaue Position eines NES in XIAP getroffen werden. Demnach soll im Folgenden geklärt werden, ob die Translokation von XIAP möglicherweise auf einen LMB-sensitiven Interaktionspartner von XIAP zurückzuführen sein könnte.

3.1.3.1 Lokalisationsanalyse von kotransfiziertem XIAP und Survivin

Da bereits beschrieben wurde, dass Survivin ein potenter Interaktionspartner von XIAP ist, wurde XIAP_{WT}-GFP transient mit Survivin_{WT}-BFP und Survivin_{NESMT}-BFP in Hela-Zellen ko-transfiziert und die Lokalisation von XIAP und Survivin 24 h später, mikroskopisch ausgewertet. Zur Analyse der korrekten Expression und Lokalisation der genannten Proteine wurden diese zunächst jeweils einzeln transient exprimiert. XIAP_{WT}-GFP lokalisiert primär im Zytoplasma und schwach im Nukleus (Abb. 29A). Survivin_{WT}-BFP ist ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert, wohingegen die Export-defiziente Survivin Mutante Survivin_{NESMT}-BFP eine ausgeprägte Kernakkumulation zeigt (Abb. 29B und 29C). Wird XIAP_{WT}-GFP mit Survivin_{WT}-BFP kotransfiziert, kolokalisieren beide Proteine im Zytoplasma (Abb. 29F). Allerdings ist keine Lokalisationsänderung von XIAP_{WT}-GFP oder Survivin_{WT}-BFP gegenüber den Einzeltransfektionen detektierbar (Abb. 29D und 29E). Wird XIAP_{WT}-GFP mit Survivin_{NESMT}-BFP kotransfiziert, zeigt sich eine nur geringe Ko-Lokalisation (Abb. 29I). XIAP_{WT}-GFP ist weiterhin im Zytoplasma vorzufinden, wohingegen Survivin_{NESMT}-BFP nukleär lokalisiert (Abb. 29G). Demnach hat auch die Kotransfektion mit der Survivin Export-defizienten Mutanten keinen Einfluss auf die subzelluläre Position von XIAP (Abb. 29H).

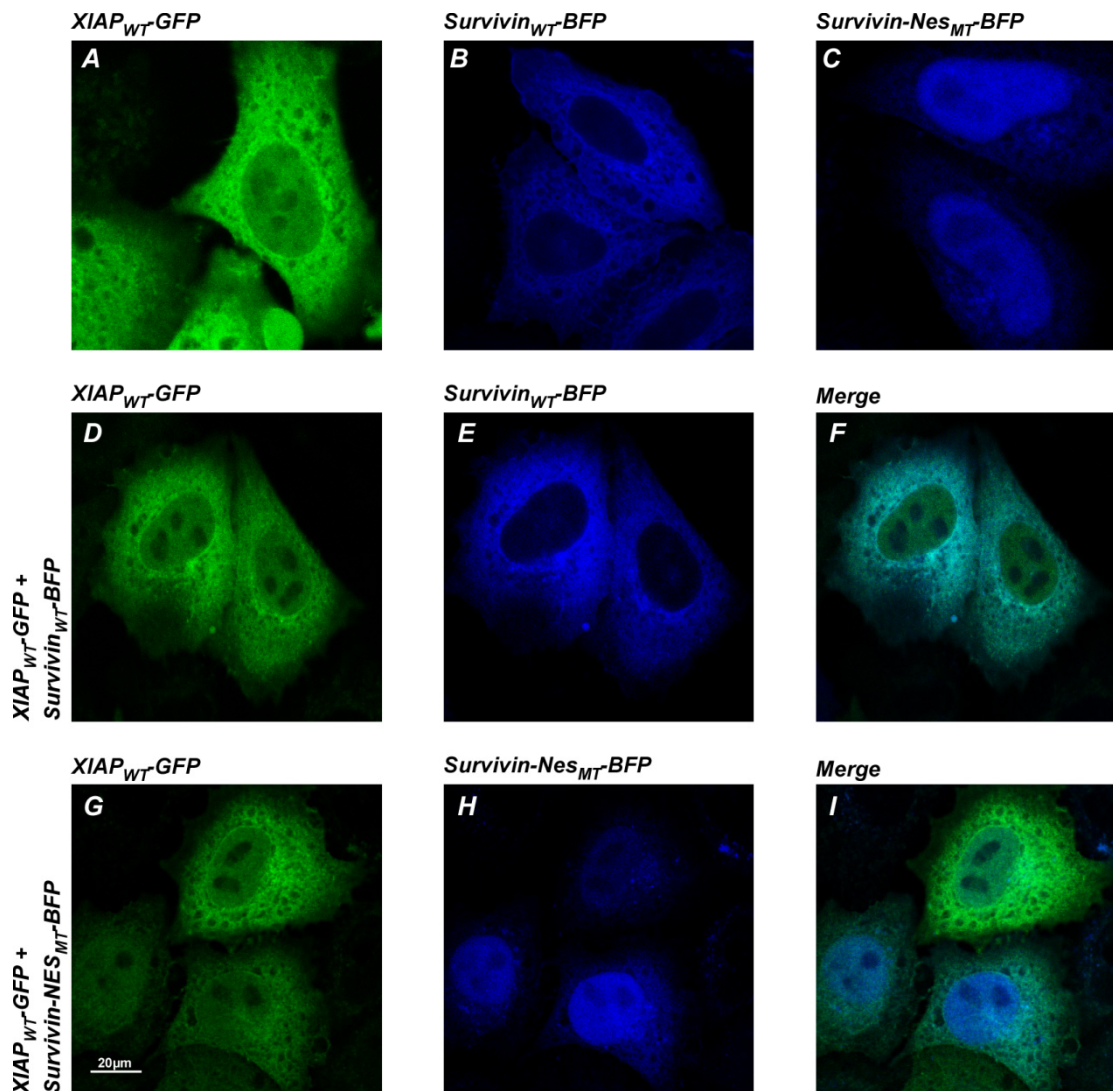


Abb. 29 – Survivin hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von XIAP

Hela-Zellen wurden jeweils mit XIAP_{WT}-GFP und Survivin_{WT}-BFP (D-F) sowie XIAP_{WT}-GFP und der Export-defizienten Mutante Survivin_{NESMT}-BFP (G-I) kotransfiziert und 24 h später am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Kotransfektion (D-J) zeigt keinen Einfluss auf die Lokalisation der Proteine im Vergleich zu den jeweiligen Einzeltransfektionen (A-C). Maßstabsbalken, 20 μm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.3.2 Lokalisationsanalyse von XAF1 nach LMB-Behandlung

Ein weiterer essentieller Interaktionspartner von XIAP und somit ein ebenfalls wichtiger Faktor in der Apoptose ist das Protein XAF1. Diese Interaktion initiiert den Abbau von Survivin und verhindert zeitgleich die Inhibition der Caspasen, wodurch die anti-apoptotische Wirkung von XIAP aufgehoben wird (Arora *et al.*). Da gezeigt wurde, dass XAF1 im Zellkern akkumuliert (Peter Liston und Tamai 2001), XIAP aber im Zytoplasma exprimiert wird, sollte im Folgenden geklärt werden, wie diese beiden Proteine miteinander in Kontakt treten können.

XAF1_{WT}-mCherry wurde hierzu transient in Hela-Zellen überexprimiert und 24 h später für drei Stunden mit LMB (10 nM) inkubiert und mikroskopisch analysiert. Hiernach fällt auf, dass XAF1 zunächst nicht im Kern sondern im Zytoplasma der Zelle lokalisiert (Abb. 30A). Die vormals beschriebene Kernlokalisation von XAF1_{WT}-mCherry ist erst nach LMB-Inkubation zu detektieren (Abb. 30B).

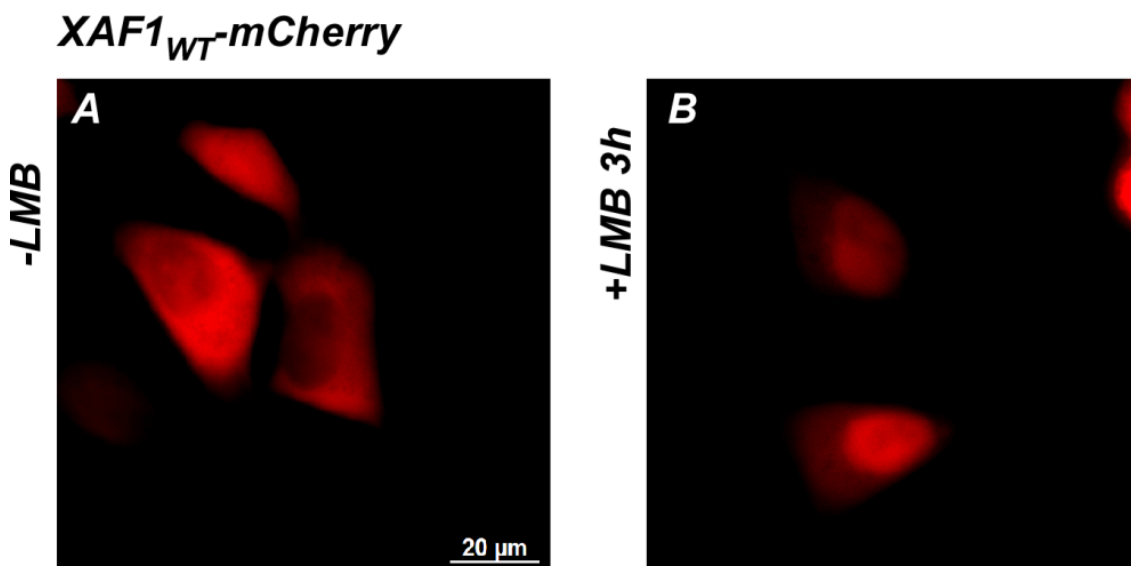


Abb. 30 – XAF1 akkumuliert erst nach LMB-Behandlung im Zellkern

Hela-Zellen wurden mit XAF1_{WT}-mCherry transfiziert und 24 h später für drei Stunden mit LMB (10 nM) behandelt. Die Analyse der Proteinlokalisation erfolgte vor und nach der LMB-Behandlung am Fluoreszenzmikroskop. Maßstabsbalken, 20 μm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.1.3.3 Lokalisationsanalyse von kotransfiziertem XIAP und XAF1

Um die Interaktion und Lokalisation von XIAP und XAF1 im Rahmen dieser Arbeit noch einmal zu bestätigen und eventuelle Auswirkungen dieser Wechselwirkung zu analysieren, wurden XIAP_{WT}-GFP und XAF1_{WT}-mCherry für 24 h transient in Hela-Zellen ko-exprimiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Als Ergebnis der Kotransfektion ist im Vergleich zur Einzeltransfektion (Abb. 14 und Abb. 30) verteilen sich XIAP und XAF1 homogen in der gesamten Zelle (Abb. 31A und 31B). Werden die kotransfizierten Zellen für drei Stunden mit LMB (10 nM) behandelt, translozieren beide Proteine in den Nukleus (Abb. 31D und 31E). In den Überlagerungen, lässt sich unter beiden Bedingungen (+/- LMB) erkennen, dass XIAP und XAF1 in der gesamten Zelle kolokalisieren und LMB damit keinen Einfluss auf deren Interaktion hat (Abb. 31C und 31F).

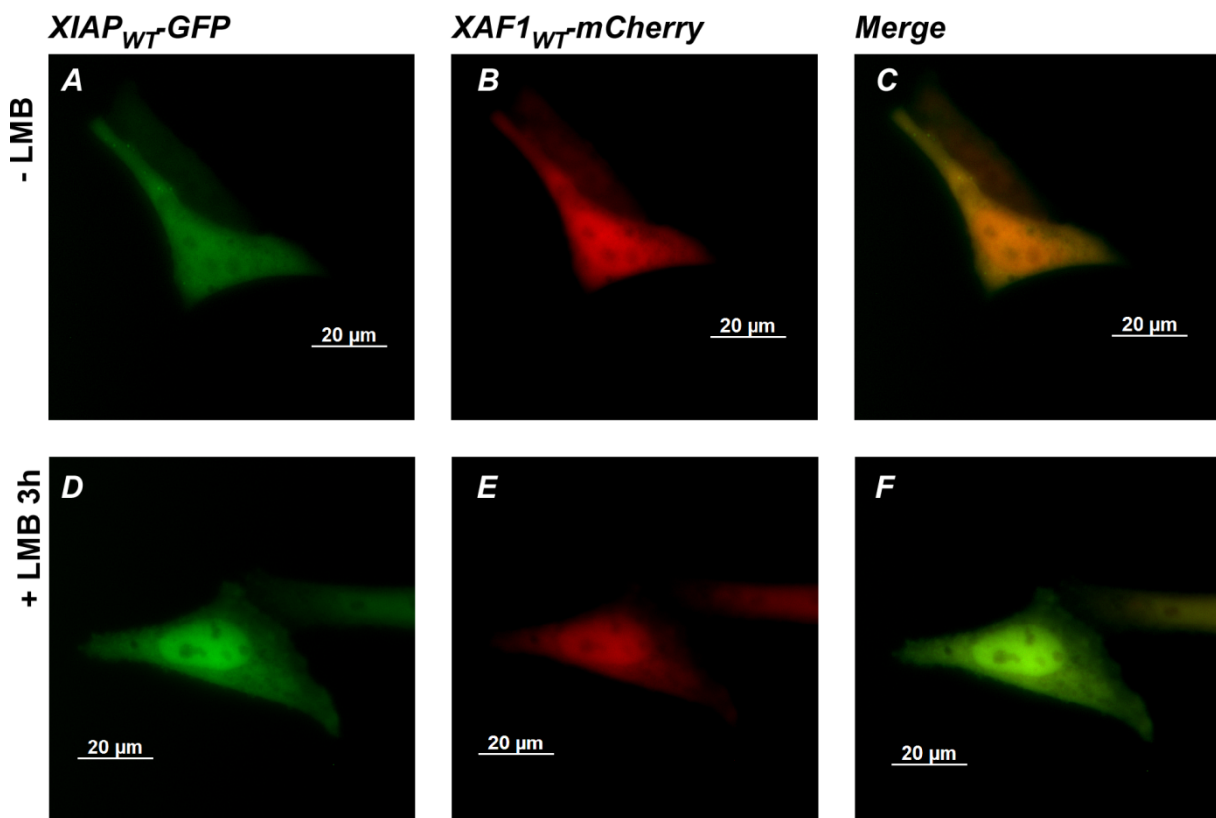


Abb. 31 – Lokalisationsanalysen von XIAP_{WT} und XAF1_{WT} nach Kotransfektion und Export-Inhibition

XIAP_{WT}-GFP & XAF1_{WT}-mCherry wurden in Hela-Zellen kotransfiziert und 24 h später mit LMB behandelt. Die Zellen wurden vor (A-C) und nach (D-F) der LMB-Behandlung fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Maßstabsbalken, 20 μm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.2 – Analyse eines möglichen Zusammenspiels von Survivin und anderen IAPs

Neben den im ersten Teil beschriebenen endogenen Apoptose-Inhibitoren Survivin und XIAP zählen noch sechs weitere Proteine zur Familie der IAPs (Abb. 6). Ein dabei bis heute wenig beachtetes Mitglied dieser IAP-Familie, ist Livin. In seinem Aufbau mit nur einer BIR-Domäne und seiner geringen Größe (38/36 kDa), ähnelt es dem noch kleineren IAP Survivin. Allerdings besitzt Livin im Gegensatz zu Survivin eine C-terminale RING-Domäne mit E3-Ligase Aktivität (Abb. 9). Zudem gehört Livin zu den IAPs, für welche sowohl anti- als auch pro-apoptotische Funktionen beschrieben sind (Abd-Elrahman *et al.*).

Die Tatsache, dass Survivin keine RING-Domäne besitzt und primär durch Interaktionen mit Proteinen wie denen des *Chromosomal Passenger Complex* (CPC) oder XIAP seine Funktionen in der Mitose oder der Apoptose erfüllt, legt nahe, dass Survivin möglicherweise noch weitere, bislang unbekannte Protein-Interaktionen eingehen kann. Aus diesem Grund sollten im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob Livin im Rahmen seiner pro- oder anti-apoptotischen Funktionen mit Survivin wechselwirkt und welche Auswirkungen ein derartiges Zusammenspiel auf Livin und dessen Aufgaben in der Zelle haben kann.

3.2.1 Lokalisationsanalyse von kotransfiziertem Livin und Survivin_{WT}/Survivin_{NesMT}

Um eine mögliche Interaktion von Survivin_{WT} und Livin_{WT} und deren Konsequenz auf deren subzelluläre Lokalisation zu untersuchen, wurden Survivin_{WT}-GFP/ Survivin_{NesMT}-GFP und Livin_{WT}-Myc transient in Hela-Zellen für 24 h ko-exprimiert. Die Detektion der Ko-Expression erfolgte für Survivin über die GFP-Fusion und für Livin mittels α -Myc-Antikörper. Survivin_{WT}-GFP ist ausschließlich im Zytoplasma detektierbar, wohingegen Livin überwiegend im Kern lokalisiert und nur zu geringem Anteil im Zytoplasma (Abb. 32A und 32B). Die Ko-Expression des Wildtyps von Livin und Survivin zeigt keinen Einfluss auf deren Lokalisation innerhalb der Zelle. So zeigt sich in der Kolokalisation der beiden Proteine nur eine Überlagerung im Zytoplasma, nicht aber im Kern (Abb. 32D).

Nach Ko-Expression von Livin mit der Export-defizienten und somit nukleär lokalisierten Mutante von Survivin (Abb. 32E), erhöht sich zeitgleich auch die Menge an nukleärem Livin (Abb. 32F, vgl. 32.B). In der Überlagerung ist durch die intensive Hoechst33342-Färbung und die starke nukleäre GFP Fluoreszenz die Kolokalisation von Survivin_{NesMT}-GFP und Livin_{WT}-Myc nicht deutlich zu erkennen (Abb. 32H).

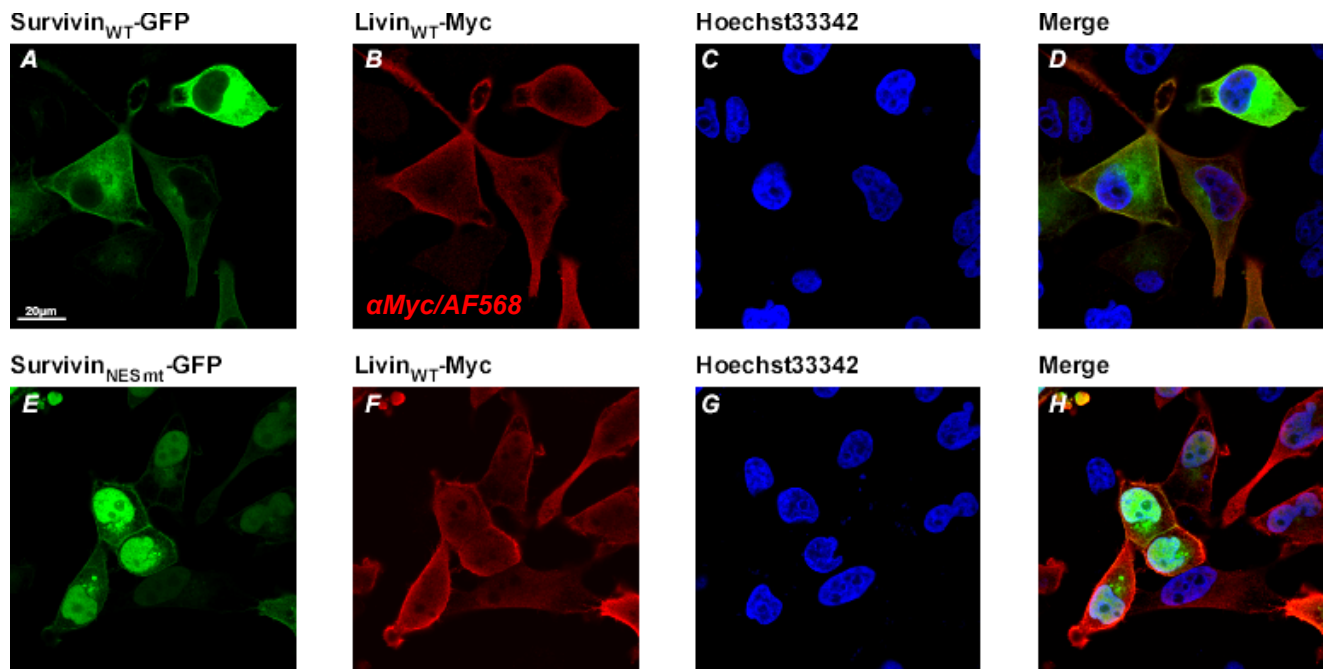


Abb. 32 – Die Ko-Expression von Livin mit Survivin_{NESMT} führt zu einer verstärkten Kernlokalisierung von Livin

HeLa-Zellen wurden mit Survivin_{WT}-GFP (A-D)/ Survivin_{NESMT}-GFP (E-H) und Livin_{WT}-Myc kotransfiziert, nach 24 h fixiert und mit einem α -Myc spezifischen Antikörper gegengefärbt (B/F). Die Zellen wurden anschließend fluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Livin lokalisiert nach Kotransfektion von Survivin_{NESMT}-GFP stärker im Kern. Die Kerne wurden mit Hoechst33342 gefärbt (C/G). Maßstabsbalken, 20 μ m. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.2.2 Biochemische Interaktionsanalyse von Livin und Survivin

Basierend auf den Resultaten der mikroskopischen Analysen (Abb. 29) sollte mittels Ko-Immunpräzipitation die Interaktion von Livin und Survivin biochemisch nachgewiesen werden. Dazu wurde Survivin_{WT}-Myc jeweils mit Livin_{WT}-GFP, XIAP_{WT}-GFP oder GFP in 293T-Zellen kotransfiziert. Nach 24 h wurde das Gesamtzelllysat mit einem α -GFP Antikörper präzipitiert. GFP dient hierbei als Negativkontrolle und XIAP_{WT} als Positivkontrolle (Abb. 33A und 33B). Borealin_{WT}-Flag wird mit Survivin_{WT}-GFP als Positivkontrolle für die erfolgreiche Durchführung der Ko-IP verwendet (Abb. 33). Input und Eluat der IP wurden im Western-Blot mittels α -GFP, α -Myc und α -Flag Antikörper untersucht. Alle überexprimierten Proteine konnten im Input detektiert werden (Abb. 33A und 33C).

Im Eluat zeigt sich, dass Survivin_{WT}-Myc (16,5 kDa) sowohl mit Livin_{WT}-GFP als auch mit XIAP_{WT}-GFP kopräzipitiert werden konnte, im Gegensatz zur GFP-Negativkontrolle

(Abb. 33B). Ebenfalls wurden Survivin_{WT}-GFP und Borealin_{WT}-Flag kopräzipitiert (Abb. 33C). Die Ergebnisse zeigen, dass Livin und Survivin miteinander interagieren.

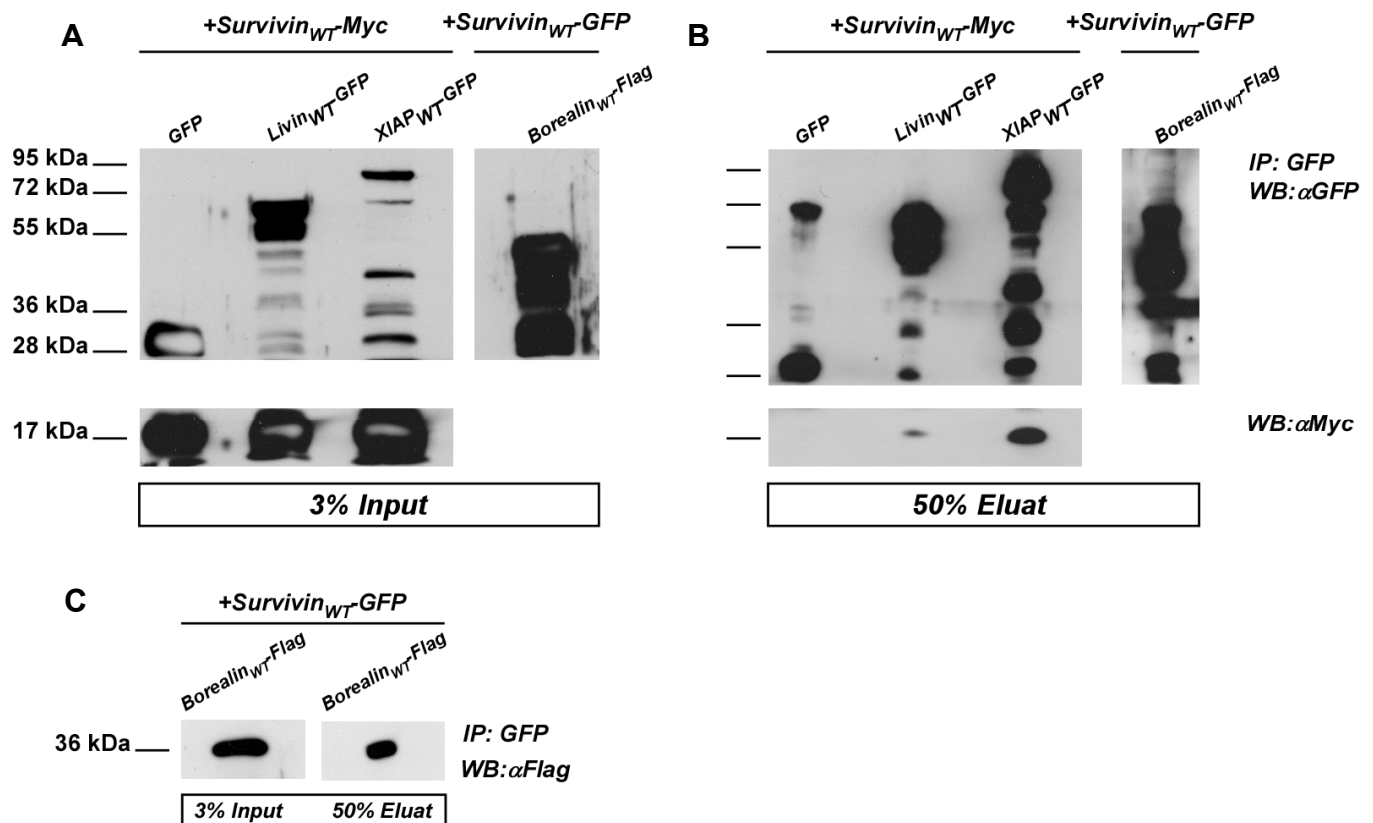


Abb. 33 – Nachweis der Interaktion von Survivin und Livin mittels Ko-Immunpräzipitation

Ko-Immunpräzipitation von Gesamtzelllysaten von 293T-Zellen, welche mit den angegebenen Plasmiden transfiziert wurden. Als Positivkontrolle diente XIAP_{WT}-GFP und als Negativkontrolle pC3-GFP. Die linke Seite zeigt 3 % des Inputs (A), die rechte 50 % des Eluates (B). Zur allgemeinen Qualitätskontrolle der IP wurde Borealin_{WT}-Flag als bekannter Interaktionspartner von Survivin verwendet (C). Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.2.3 Interaktionsanalyse von Livin und Survivin *in vitro*

Nachdem die Interaktion von Livin und Survivin biochemisch im Gesamtzelllysat nachgewiesen werden konnte, sollte durch *in vitro*-Translation (IVT) und anschließenden GST-Pulldown untersucht werden, ob auch im zellfreien Milieu eine direkte Interaktion stattfindet oder ggf. weitere Bindepartner als Adapter fungieren sowie post-translationale Modifikationen von Bedeutung sind. In einer kombinierten *in vitro*-Transkriptions- und

Translationsreaktion wurden Borealin_{WT}-Flag als Positivkontrolle, eine Negativkontrolle mit H₂O und Livin_{WT}-Myc eingesetzt (Abb. 34A). Die Bindepartner GST-Survivin_{WT}-GFP und GST-GFP wurden bakteriell hergestellt und aufgereinigt. Nach 30-minütiger Präinkubation und vierstündiger *Pulldown*-Reaktion konnte zwar eine Interaktion von Borealin_{WT}-Flag und dem translatierten GST-Survivin_{WT}-GFP, aber nicht zwischen Livin_{WT}-GFP und GST-Survivin_{WT}-GFP nachgewiesen werden (Abb. 34B). Aufgrund dieser Ereignisse ist eine direkte Interaktion von Livin und Survivin als unwahrscheinlich anzusehen.

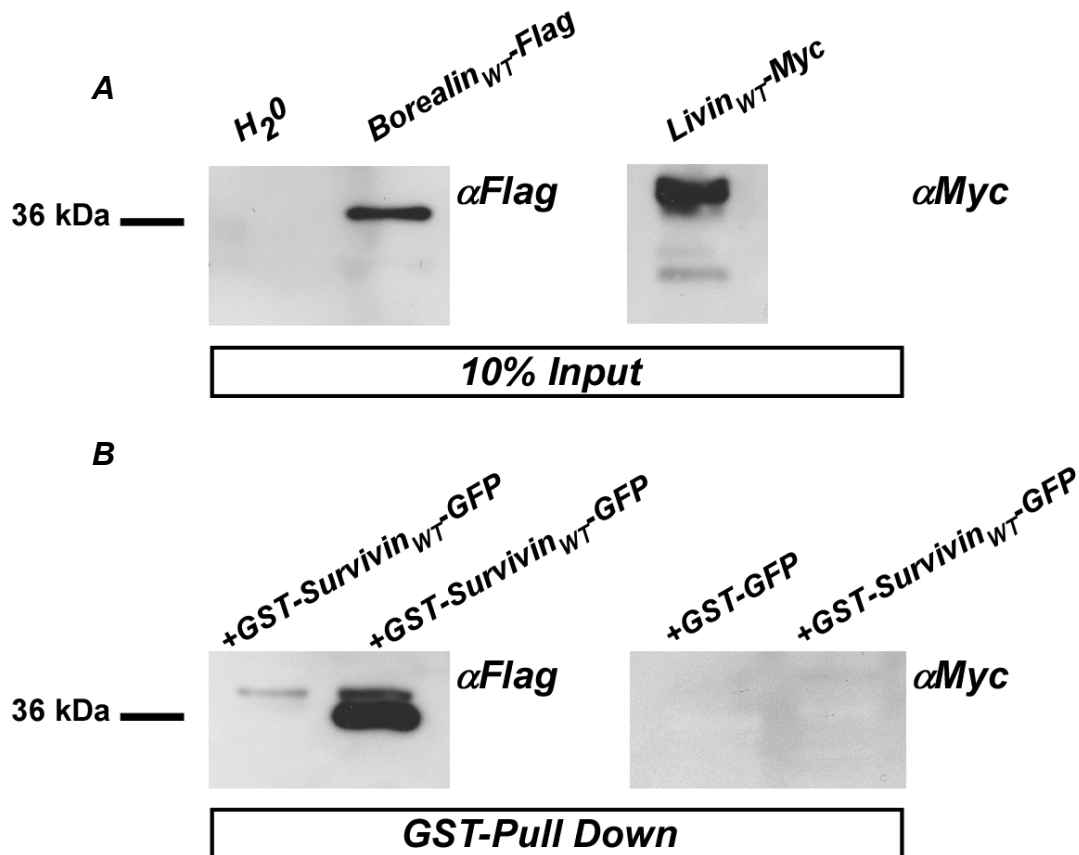


Abb. 34 – GST-Pulldown von Survivin_{WT}-GFP mit Livin_{WT}-Myc

In vitro-transkribiertes und translatiertes Livin_{WT}-Myc oder Borealin_{WT}-Flag wurden mit bakteriell exprimiertem GST-Survivin_{WT}-GFP und GST-GFP inkubiert. Die Proteine wurden über GST aufgereinigt und mittels α-Flag-, bzw. α-Myc-Antikörper im Western-Blot detektiert. Borealin_{WT}-Flag diente als Positivkontrolle und GST-GFP als Negativkontrolle. 10 % der IVT wurden vor dem Pulldown (B) als Kontrolle aufgetragen (A). Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.2.4 Expression des Apoptose-Inhibitors Livin

Um im Folgenden zu klären, welche Zellen sich am besten für spätere Experimente zur Analyse von endogenem Livin eignen, wurden zunächst diverse Zelllinien bezüglich ihrer endogenen Livin-Expression analysiert. Hierzu wurden die Zellen lysiert und per SDS-PAGE und Western-Blot auf die Expression von Livin hin untersucht. So konnte nur in der Melanoma Zelllinie SK-Mel37 eine ausreichend hohe Menge an endogenem Livin nachgewiesen werden. In den weiteren verwendeten Zelllinien war keine endogene Livin-Proteinexpression nachweisbar (Abb. 35).

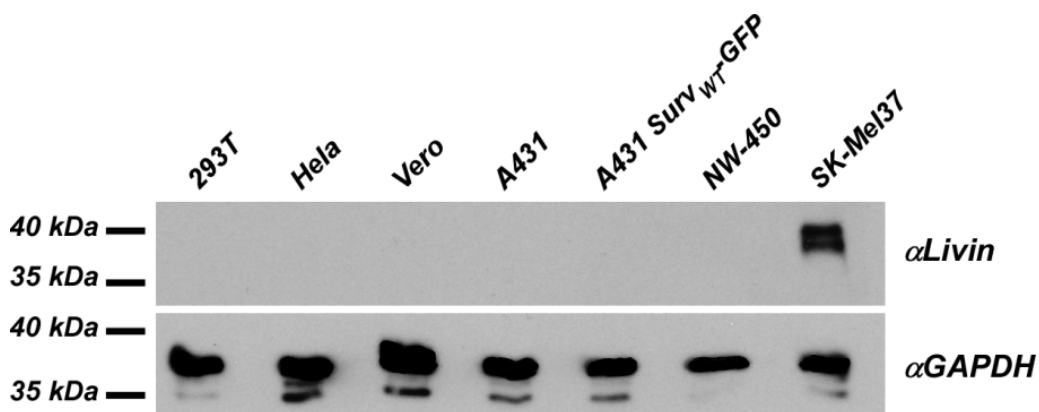


Abb. 35 – Expression von endogenem Livin in unterschiedlichen Zelllinien

Verschiedene Zelllinien wurden per Western-Blot auf die Expression von endogenem Livin untersucht. GAPDH diente als Ladekontrolle. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.2.5 Livin-Deletionskonstrukte für Funktions- und Interaktionsanalysen

Basierend auf den Ergebnissen zur Interaktion von Livin_{WT} und Survivin_{WT} im Zelllysat sollten Livin und seine Funktionen genauer untersucht werden. Dazu wurden zusätzlich zu dem bereits verwendeten Livin_{WT}-GFP verkürzte Konstrukte generiert (Tab.12). Neben Livin_{WT} mit C-terminalem mCherry- und N-terminalem Myc-tag sollten die bereits publizierten Livin-Fragmente, welche durch die Spaltung von Caspase-3 entstehen, kloniert und analysiert werden (Boaz Nachmias 2003).

Über die Spaltung von Livin durch Caspase-3 werden ein kurzes N-terminales sowie ein langes C-terminales Teilstück erzeugt. Für die experimentellen Studien wurden diese Fragmente mit einem C-terminalen GFP-Marker versehen und werden im Folgenden mit tLivin_{short}-GFP und tLivin_{long}-GFP bezeichnet. Die bislang dokumentierte Domänenorganisation des Proteins einschließlich der Caspase-Schnittstelle ist Abbildung 36 dargestellt.

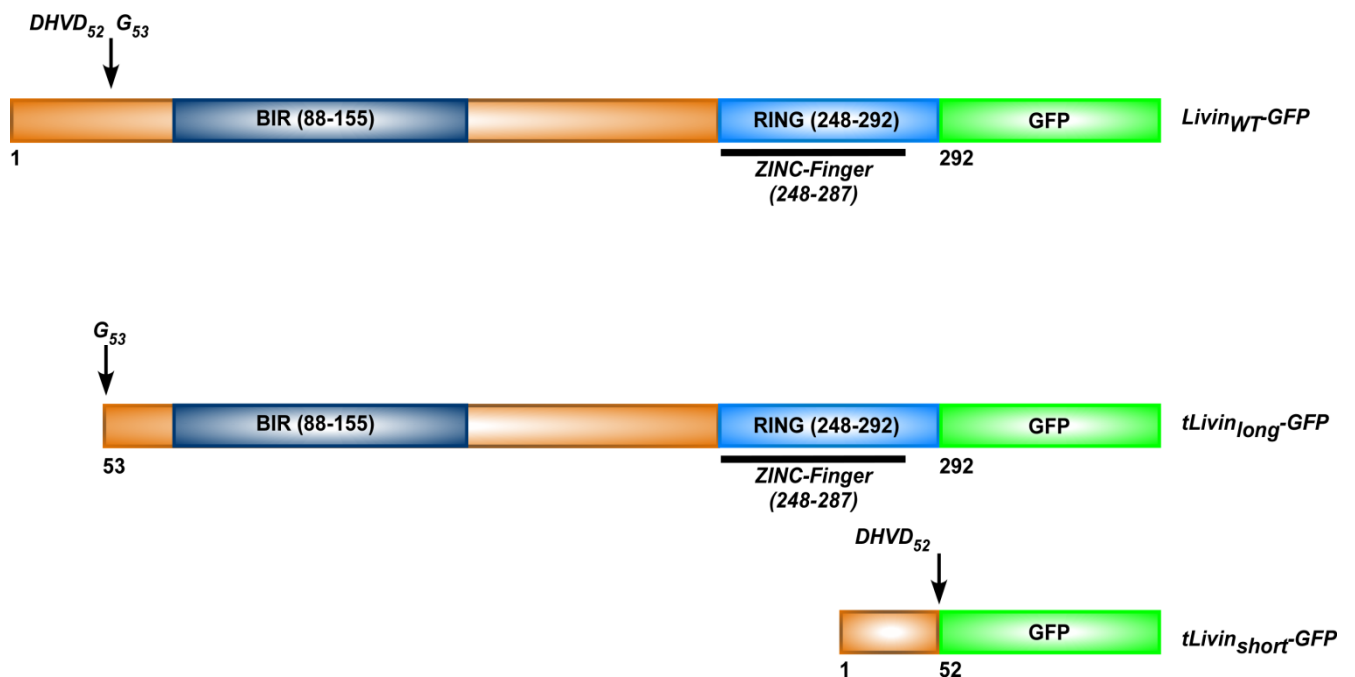


Abb. 36 – Schematische Darstellung der Livin-GFP Expressions-Konstrukte

Die beiden trunkierten Formen von Livin (*Short* und *Long*) wurden wie auch die Wildtyp-Variante von Livin mit einem C-terminalen GFP fusioniert. Die BIR- (*Baculovirus IAP-Repeat*) und RING- (*Really Interesting New Gene*) Domäne sind in dunkel- und hellblau illustriert. Die Aminosäuresequenz [DHVD₅₂G] der Caspase-Schnittstelle an der Livin gespalten wird ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Nicht dargestellt sind hier die C-terminal mit Myc und mCherry markierten Livin-Konstrukte. Aminosäureangaben in Klammern.

3.2.6 Lokalisationsanalyse von tLivin_{short} und tLivin_{long}

Im ersten Schritt sollte die Lokalisation der Livin-Konstrukte im Vergleich zum Wildtyp bestimmt werden. Livin_{WT}-GFP und die beiden trunkierten Formen (tLivin_{short}-/ tLivin_{long}-GFP) wurden dazu in Hela-Zellen transient für 24 h exprimiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigt, dass Livin_{WT}-GFP primär im Zellkern exprimiert wird und in geringerer Menge im Zytoplasma (Abb. 37A). Dahingegen findet sich die trunkierte lange Form von Livin ausschließlich in der perinukleären Region (Abb. 37B). Die trunkierte kurze Form von Livin kann wie der Wildtyp primär im Kern und im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 37C).

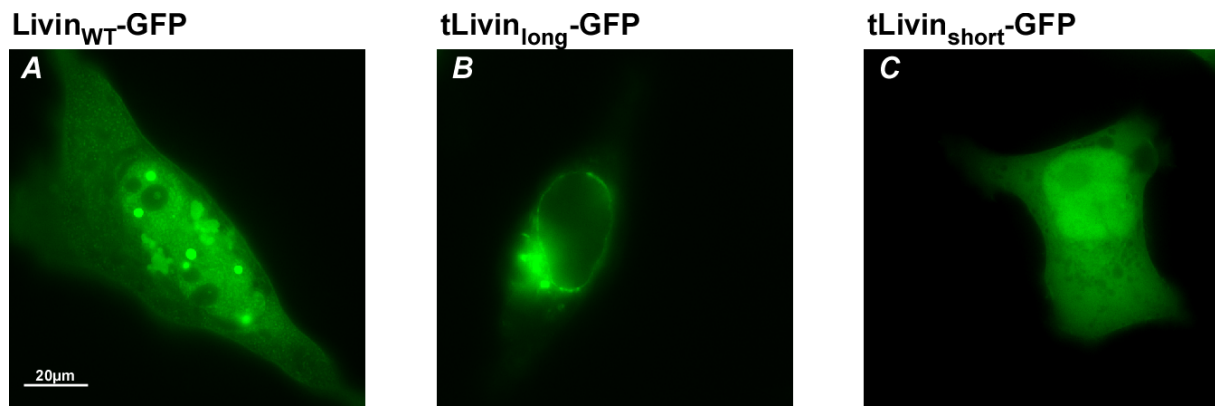


Abb. 37 – Lokalisation der trunkierten Livin-GFP Konstrukte

Livin_{WT}-GFP und die trunkierten Livin-Konstrukte tLivin_{long}-GFP und tLivin_{short}-GFP wurden in HeLa-Zellen für 24 h transient überexprimiert und am Fluoreszenzmikroskop untersucht (A-C). Maßstabsbalken, 20 μ m. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.2.7 Lokalisationsanalyse von tLivin_{short} und tLivin_{long} mit Organellmarker für den Golgi-Apparat

Weiterhin sollte die subzelluläre Lokalisation von tLivin_{short}- und tLivin_{long}-GFP in Verbindung mit unterschiedlichen Organellmarkern untersucht werden. So wurden Livin_{WT}-GFP und die beiden trunkierten Livin-Formen in Kombination mit einem Marker für den Golgi-Apparat in HeLa-Zellen kotransfiziert und nach 24-stündiger Expression mikroskopisch analysiert. Die Kotransfektion beeinflusst die vorab beschriebene Lokalisation der Livin-Proteine nicht (Abb. 38A, D und G; vgl. Abb. 37). In der Überlagerung der Farbkanäle ist keine Kolo­kalisation von Livin, den Livin-Deletionsmutanten und dem Golgi-Marker (Abb. 38B, E und H) zu erkennen (Abb. 38C, F und I).

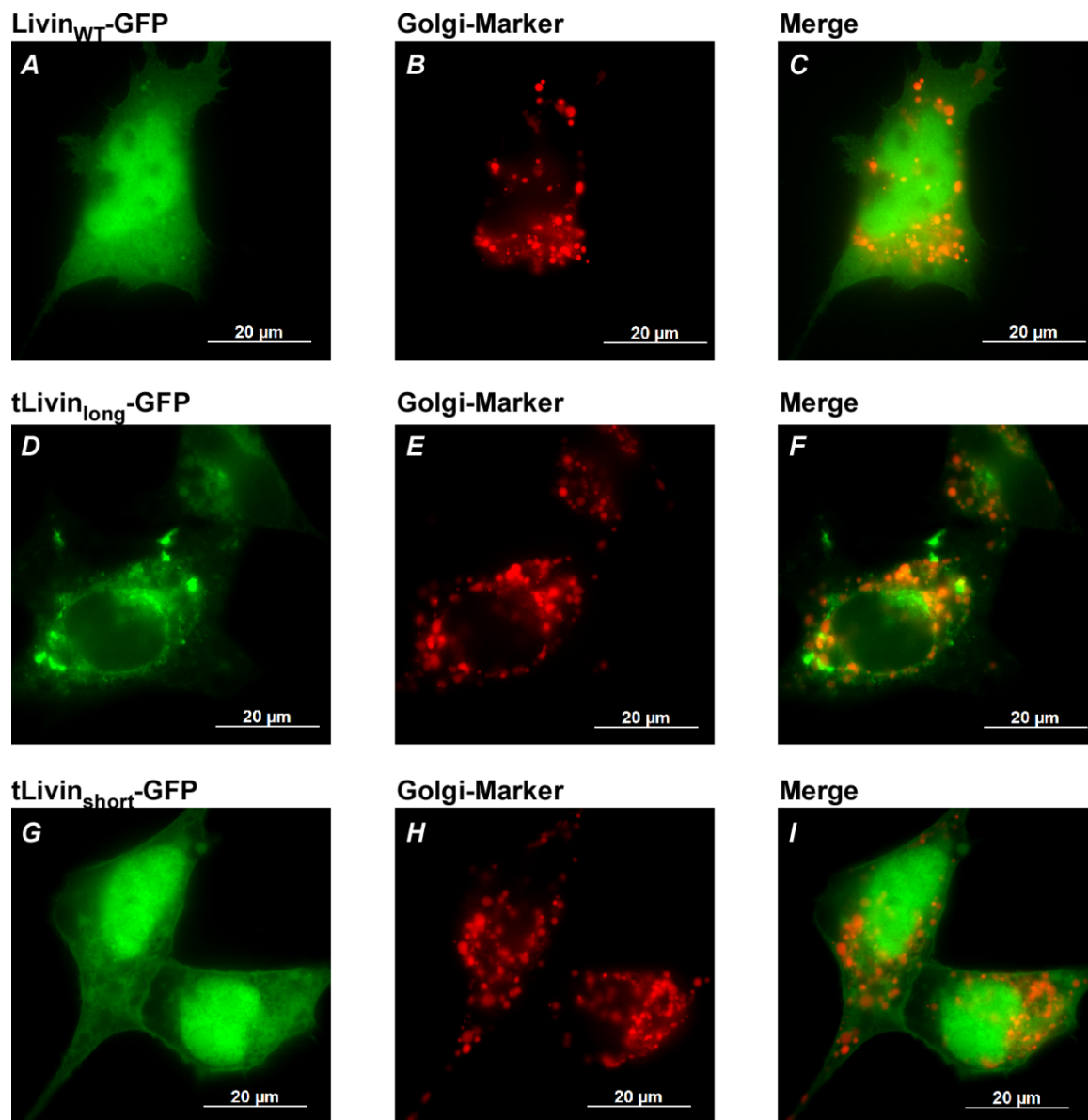


Abb. 38 – Die Livin-Konstrukte akkumulieren nicht am Golgi-Apparat

Hela-Zellen wurden mit den angegebenen Livin-GFP Konstrukten und zusätzlich mit einem Marker für den Golgi-Apparat in Hela-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen am Epi-Fluoreszenzmikroskop analysiert. Das oberste Panel zeigt den Livin-Wildtyp in Kombination mit dem Golgi-Marker (A-C), das mittlere und untere Panel dagegen die trunkierte lange (D-F) und kurze Form (G-I) von Livin. Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.2.8 Lokalisationsanalyse von tLivin_{short} und tLivin_{long} mit Organellmarker für das ER

Als nächstes wurden Livin_{WT}-GFP, tLivin_{short}- und tLivin_{long}-GFP mit einem Marker für das Endoplasmatische-Retikulum (ER) in Hela-Zellen kotransfiziert und nach 24 h fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Lokalisation der GFP-markierten Livin-Konstrukte wird durch die Kotransfektion nicht beeinflusst (Abb. 39A, D und G, vgl. Abb. 37). In der Überlagerung der Farbkanäle ist keine Kolo-kalisation zwischen Livin_{WT}-GFP bzw. der kurzen trunkierten Livin-Form (tLivin_{short}-GFP) und dem ER-Marker (Abb. 39B, E und H) zu detektieren (Abb. 39C und 39I). Die lange trunkierte Livin-Form (tLivin_{long}-GFP) hingegen zeigt eine identische Lokalisation mit dem ER-Marker (Abb. 39F). Somit kann im Gegensatz zum Wildtyp und der kurzen Livin-Form von einer Lokalisation von tLivin_{long}-GFP am endoplasmatischen Retikulum ausgegangen werden.

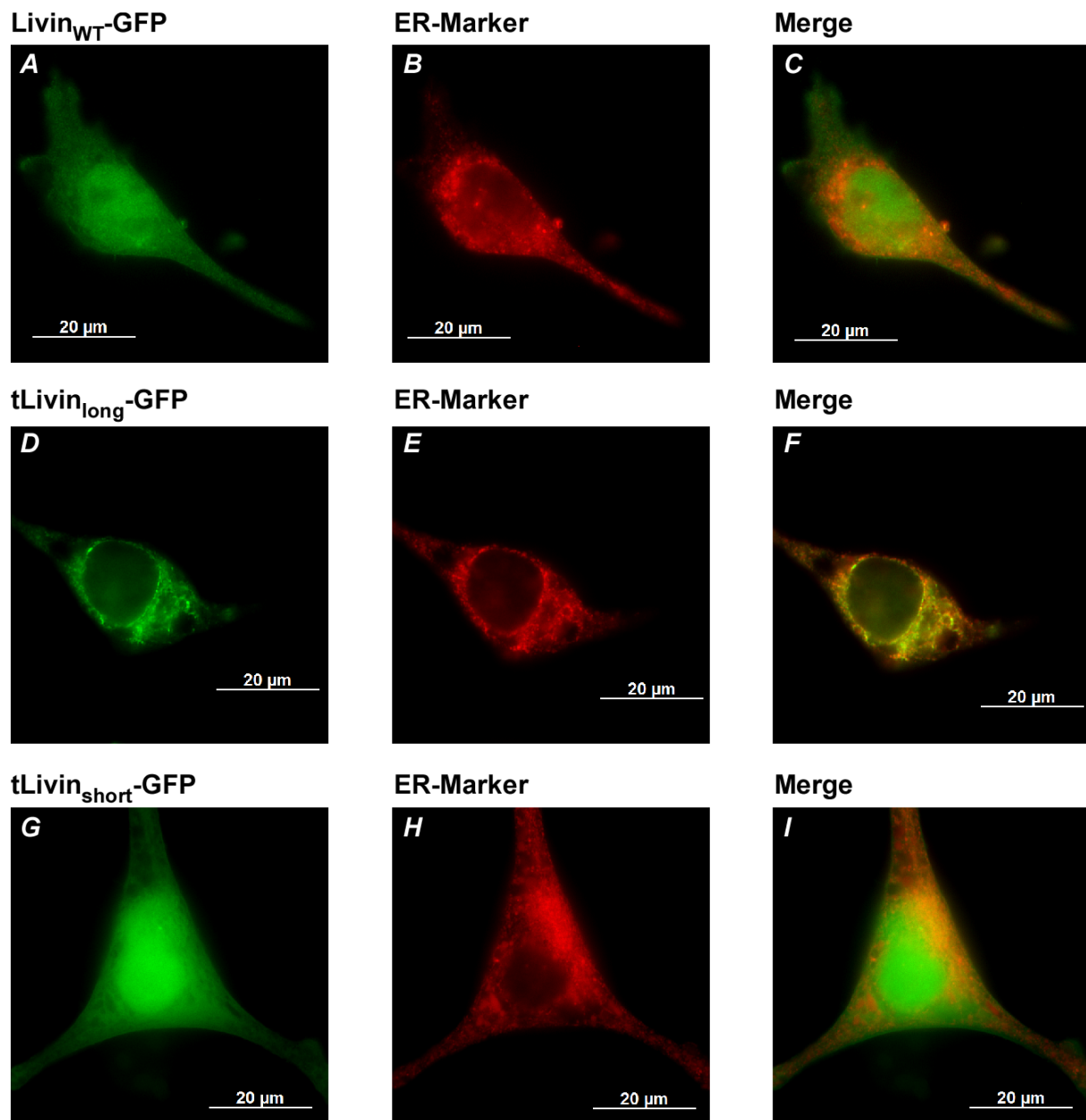


Abb. 39 – tLivin_{long} akkumuliert am Endoplasmatischen-Retikulum

Hela-Zellen wurden mit den angegebenen Livin-GFP-Konstrukten und zusätzlich mit einem Marker für das Endoplasmatische-Retikulum kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen am Epi-Fluoreszenzmikroskop analysiert. Das oberste Panel zeigt den Wildtyp von Livin in Kombination mit dem ER-Marker und deren Akkumulation in der Zelle (A-C), das mittlere und untere Panel dagegen die trunkierte lange (D-F) und kurze Form (G-I) von Livin. Maßstabsbalken, 20 μ m. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.2.9 Lokalisationsanalyse der Livin-Konstrukte nach Kotransfektion mit Survivin

Nach der über die Ko-IP nachgewiesenen Interaktion von Livin und Survivin sollte nun geklärt werden ob Survivin auch in der Lage ist, mit den trunkierten Formen im zellulären Milieu zu interagieren. 24 h nach Einzeltransfektion in Hela-Zellen lokalisieren die einzelnen Livin-Konstrukte wie bereits beschrieben (Abb. 40A, D und G). Survivin wird ausschließlich im Zytoplasma und nicht im Kern der Zelle exprimiert (Abb. 40B, E und H). In der Überlagerung der Bilder ist eine zumindest partielle Kolokalisation von Livin und Survivin im Zytoplasma zu erkennen, die Lokalisation der Proteine wird allerdings nicht wechselseitig beeinflusst (Abb. 40C, F und I).

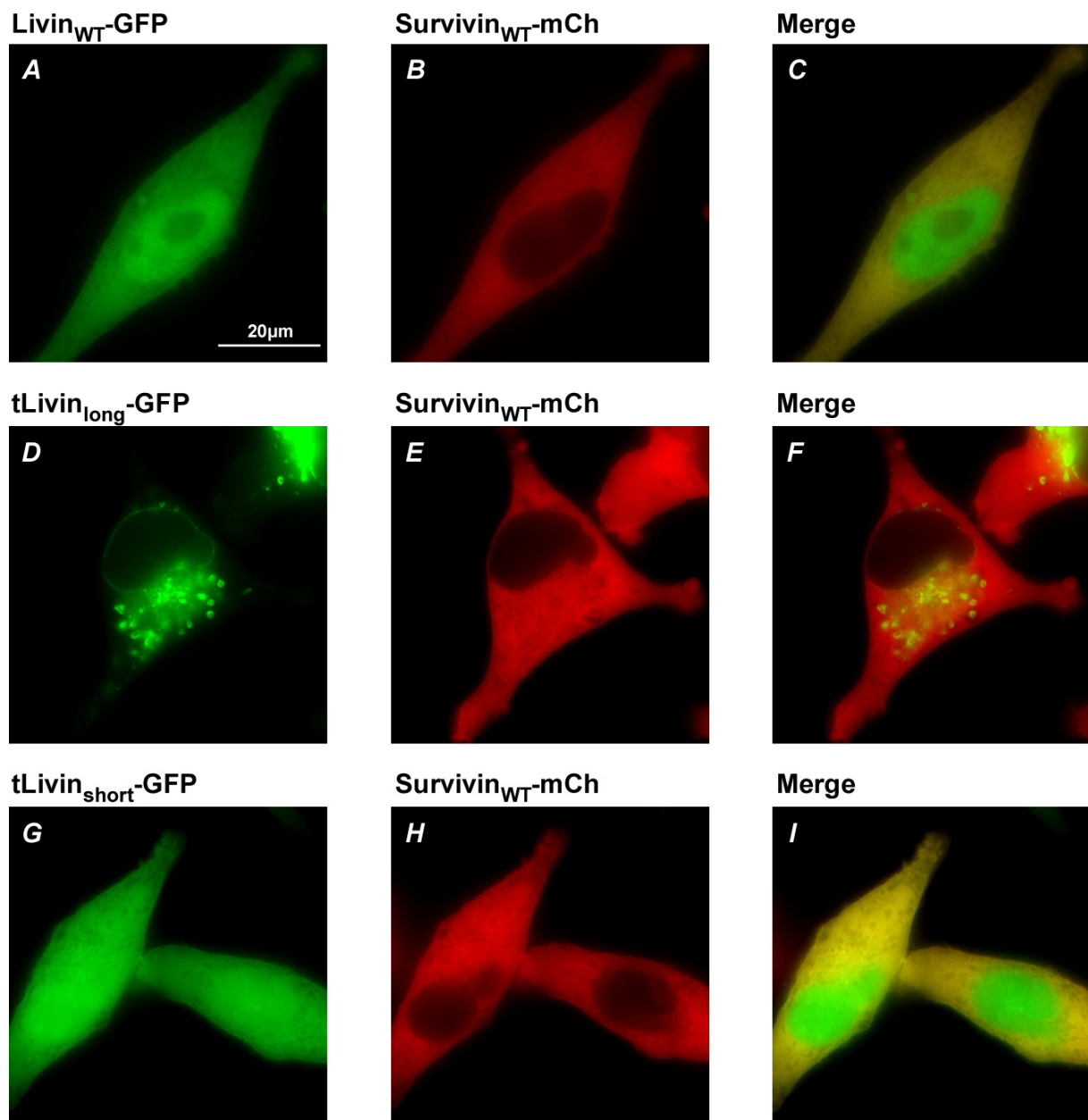


Abb. 40 – Die Ko-Expression von Survivin_{WT} und den Livin-Konstrukten führt nicht zu einer wechselseitigen Beeinflussung ihrer Lokalisation

Hela-Zellen wurden jeweils mit Livin_{WT}-GFP/ Survivin_{WT}-mCh (A-C) sowie tLivin_{long}-GFP/ Survivin_{WT}-mCh (D-F) und tLivin_{short}-GFP/ Survivin_{WT}-mCh (G-I) kotransfiziert und 24 h nach der Transfektion am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.2.10 Interaktionsanalyse von tLivin_{short} und tLivin_{long} mit Survivin

Obwohl die fluoreszenzmikroskopischen Analysen (Abb. 40) eine zumindest partielle Kolokalisation von Survivin und Livin zeigen, muss eine mögliche Interaktion von Survivin insbesondere mit den trunkierten Formen von Livin biochemisch mittels Ko-IP nachgewiesen werden. Survivin_{WT}-Myc wurde mit GFP-markiertem Volllänge-Livin und der langen Livin-Variante (tLivin_{long}-GFP), XIAP_{WT}-GFP und pc3-GFP transient in 293T-Zellen kotransfiziert. XIAP_{WT}-GFP dient hier als Positivkontrolle und pc3-GFP als Negativkontrolle. 24 h nach Transfektion wurden Gesamtzelllysate hergestellt und mittels α-GFP Antikörper präzipitiert. Sowohl der Input (Abb. 41 rechts) als auch das Eluat (Abb. 41 links) der IP wurden im Western-Blot mit α-GFP und α-Survivin Antikörper analysiert.

Alle transfizierten Konstrukte können im Input nachgewiesen werden (Abb. 41 rechts). Im Eluat zeigt sich, dass Survivin_{WT}-Myc mit tLivin_{long}-GFP und XIAP_{WT}-GFP am stärksten kopräzipitiert werden konnte. Die Ko-Interaktion von Survivin_{WT}-Myc und Livin_{WT}-GFP konnte so ebenfalls nachgewiesen werden, wenn auch in abgeschwächter Form. Über die GFP-Negativkontrolle wurde nichts kopräzipitiert (Abb. 41 links).

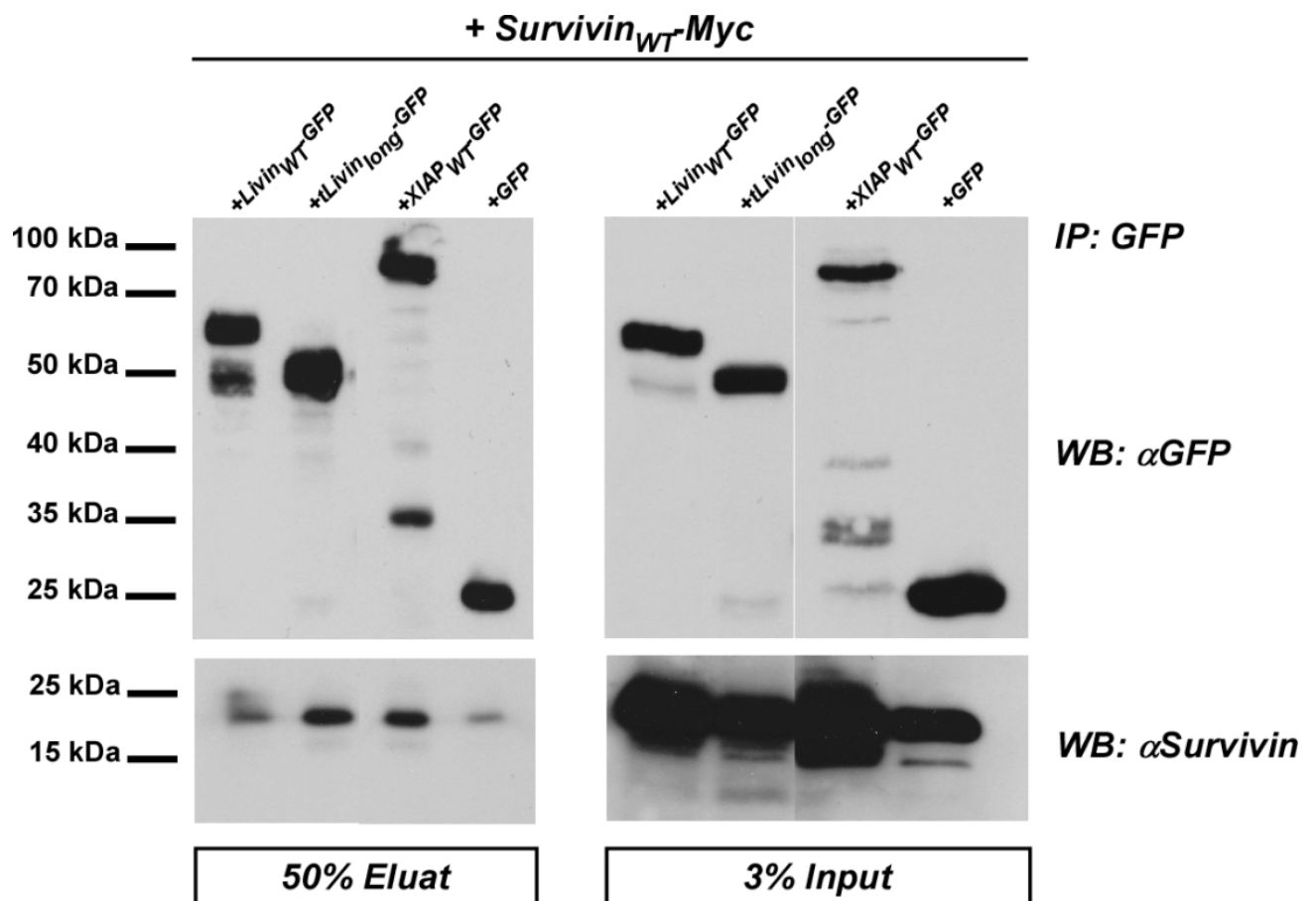


Abb. 41 – Survivin interagiert am stärksten mit tLivin_{long}

Ko-Immunpräzipitation aus Gesamtzelllysaten von 293T-Zellen, welche mit den angegebenen Plasmiden transfiziert wurden. Als Positivkontrolle diente XIAP_{WT}-GFP und als Negativkontrolle pc3-GFP. Zur Präzipitation wurde ein α -GFP Antikörper verwendet und für die Western-Blot-Detektion ein α -Survivin Antikörper. Die linke Seite zeigt 50 % des Eluats, die rechte 3 % des Inputs. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.2.11 Lokalisationsanalyse von Livin nach Kotransfektion mit Caspase-3

Ob Livin wie bisher beschrieben in der Tat durch Caspase-3 gespalten wird, sollte mittels transienter Expression von Livin_{WT}-mCh und Myc-Livin_{WT}-GFP in Kombination mit Caspase-3_{WT}-GFP in parental A431-Zellen nachgewiesen werden. Hierfür wurden zunächst Caspase-3_{WT}-GFP, tLivin_{long}-GFP, Myc-Livin_{WT}-GFP und Livin_{WT}-mCh jeweils einzeln transfiziert und deren Lokalisation nach 24 h mikroskopisch untersucht (Abb. 42A – 42D).

Nach der Kotransfektion der Caspase-3_{WT}-GFP mit Myc-Livin_{WT}-GFP ist eine intensive perinukleäre Protein-Akkumulation zu beobachten, welche in dieser Form dem Expressionsmuster von tLivin_{long}-GFP ähnelt (Abb. 42E). Da Caspase-3 und Livin_{WT}-GFP

markiert sind und eine genaue Differenzierung zwischen den beiden nicht möglich ist (Abb. 42E), wurde die Kotransfektion mit Livin_{WT} -mCh wiederholt. Diese zeigt dem vorab durchgeführten Experiment (Abb. 42E) vergleichbares Expressionsmuster. Livin_{WT} -mCherry akkumuliert ähnlich wie $\text{tLivin}_{\text{long}}$ perinukleär, während Caspase-3 $_{\text{WT}}$ -GFP nun stärker nukleär lokalisiert (Abb. 42F).

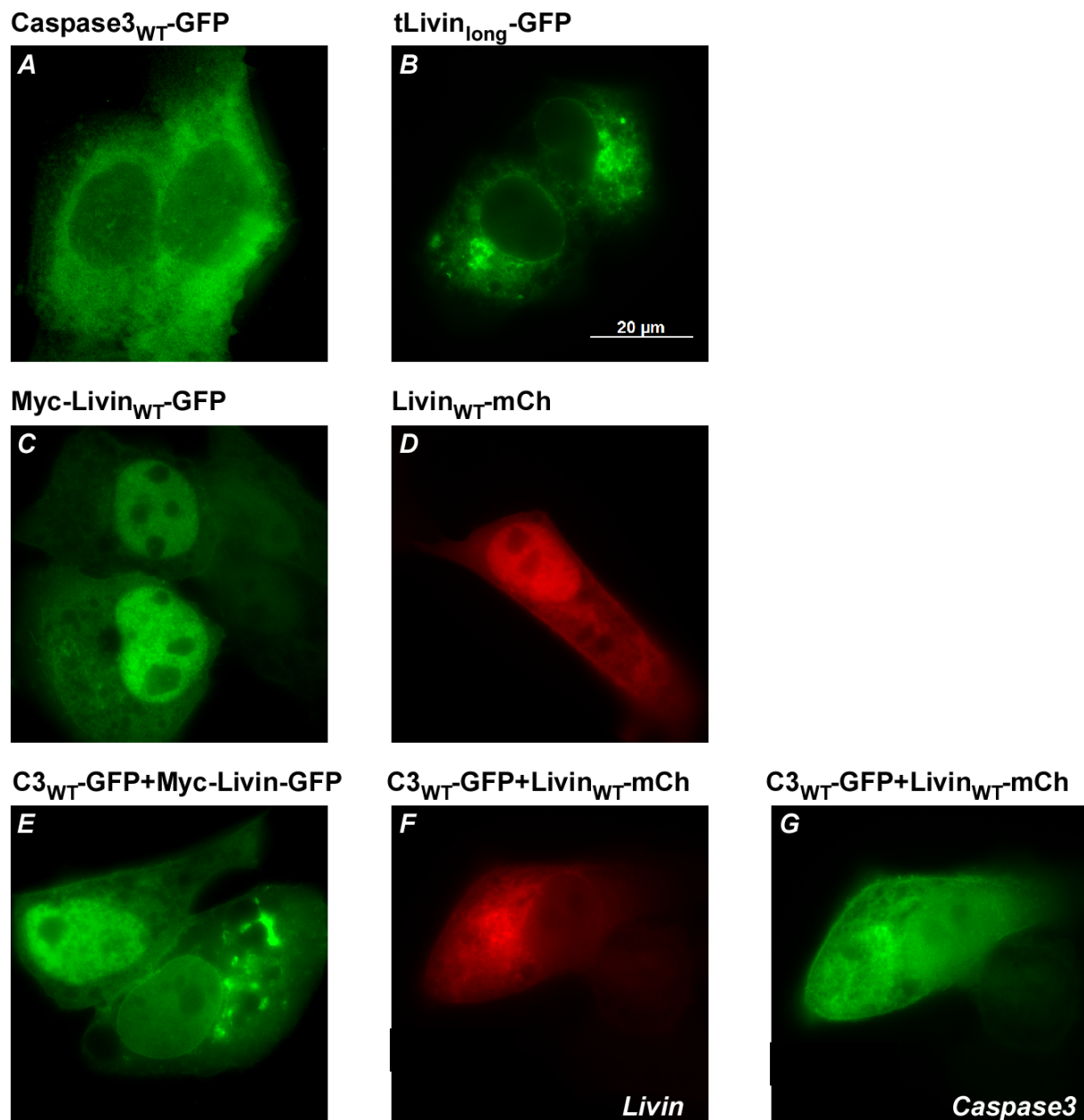


Abb. 42 – Caspase-3 beeinflusst die Lokalisation von Livin in parentalen A431-Zellen

Livin und Caspase-3 wurden in parentalen A431-Zellen einzeln und in Kombination transfiziert und ihre zelluläre Lokalisation 24 h später fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Caspase-3-GFP (A). tLivin_{long}-GFP (B). Myc-Livin-GFP (C). Livin-mCh (D). Caspase-3-GFP und Myc-Livin-GFP (E). Caspase-3-GFP und Livin-mCh/Livin (F), Caspase-3-GFP und Livin-mCh/Caspase-3 (G). Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.2.12 Lokalisationsanalyse von Livin nach Kotransfektion mit Caspase-3 in Survivin stabilen A431-Zellen

Zuletzt galt es, einen Zusammenhang zwischen der Interaktion von Livin mit Survivin und einer daraus resultierenden Funktion herzuleiten. Da beschrieben wurde, dass Survivin über Bindung an XIAP dessen Abbau zu verhindern vermag, wurde analog untersucht, ob Survivin durch die Interaktion mit Livin dessen Spaltung ebenso verhindern kann.

Hierzu wurden die vorab verwendeten Expressionskonstrukte (Abb. 42), in Survivin_{WT}-GFP stabil exprimierende A431-Zellen einzeln bzw. kotransfiziert und deren Expression 24 h später analysiert. Caspase-3_{WT}-GFP, tLivin_{long}-GFP, Myc-Livin_{WT}-GFP und Livin_{WT}-mCherry, zeigen die für sie charakteristische zelluläre Lokalisation (Abb. 43A - 43D). Nach Kotransfektion von Caspase-3_{WT}-GFP und Myc-Livin_{WT}-GFP ist die Fluoreszenz primär im Kern, aber auch im Zytoplasma zu detektieren (Abb. 40E). In diesem Fall ist weiterhin keine auffällige Akkumulation an distinkten subzellulären Strukturen erkennbar. Auf Grund der identischen Fluoreszenz-Tags von Caspase und Livin wurde auch hier, die Kotransfektion mit Livin_{WT}-mCherry wiederholt, wobei Caspase-3_{WT}-GFP und Livin_{WT}-mCh wiederum keine veränderte zelluläre Verteilung erkennen lassen (Abb. 43F-43G).

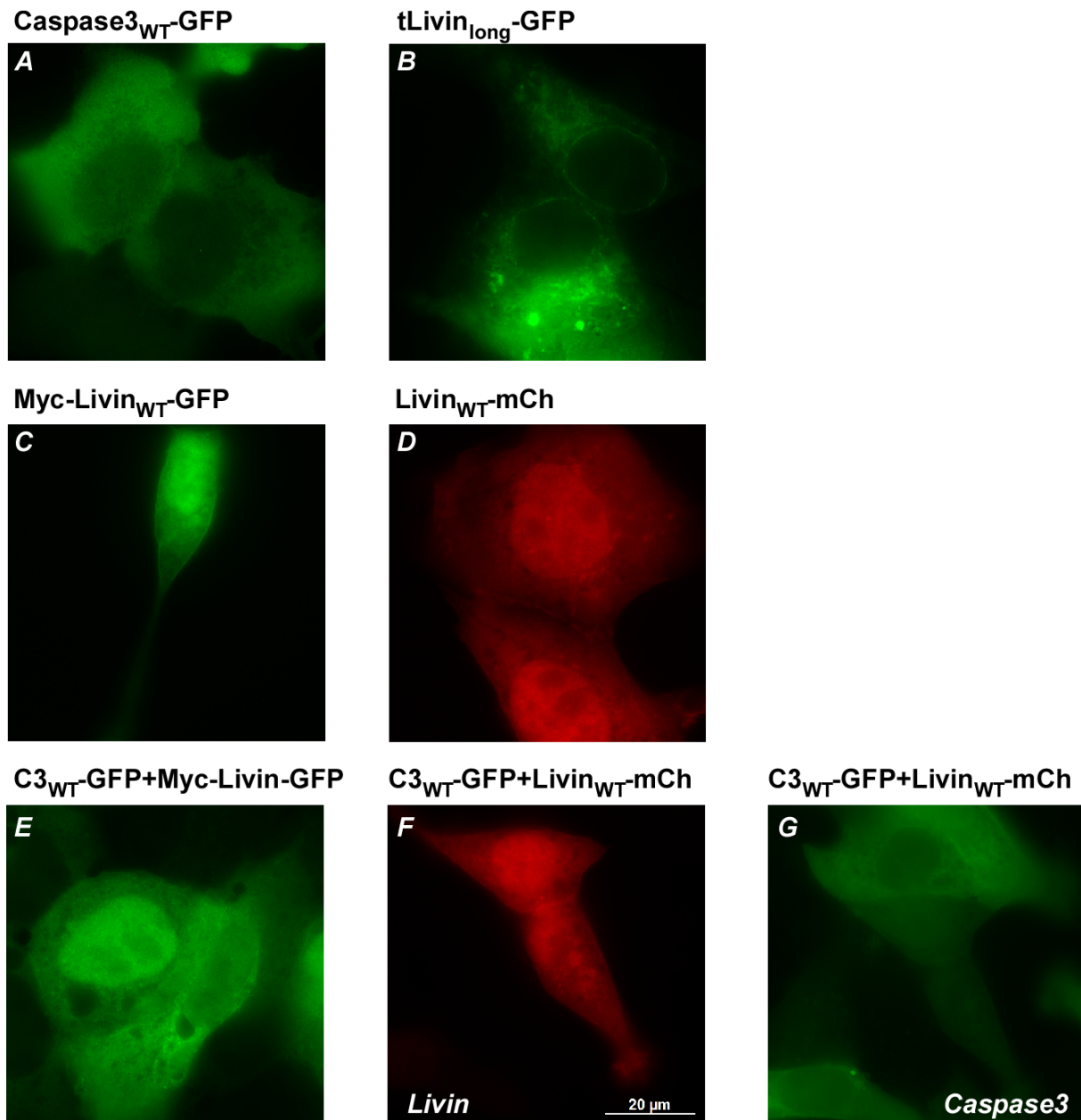


Abb. 43 – Caspase-3 hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Livin in Survivin stabilen A431-Zellen

Livin und Caspase-3 wurden in Survivin_{WT}-GFP stabil exprimierenden A431-Zellen einzeln und in Kombination transfiziert und 24 h später fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Caspase-3-GFP (A). tLivin_{long}-GFP (B). Myc-Livin-GFP (C). Livin-mCh (D). Caspase-3-GFP und Myc-Livin-GFP (E). Caspase-3-GFP und Livin-mCh/Livin (F), Caspase-3-GFP und Livin-mCh/Caspase-3 (G). Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4. Diskussion

Der Prozess der Apoptose wird durch eine Reihe proteolytischer Ereignisse vorangetrieben. Diese werden über die pro-apoptotische Proteinfamilie der Caspasen reguliert und enden mit der Eliminierung geschädigter oder nicht mehr benötigter Zellen (Srinivasula und Ashwell 2008). Dem gegenüber stehen unter anderem die anti-apoptotischen Proteine der IAP-Familie, welche somit für ein Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellüberleben sorgen (Clem *et al.* 1991). Eine Fehlregulation der IAPs kann zum Ausbleiben der Apoptose und dadurch zur Entstehung von Krebs führen. Die bisher am besten untersuchten IAPs sind Livin, XIAP und Survivin, welche auch auf Grund ihrer über die Apoptoseregulation hinausgehenden biologischen Eigenschaften zu den im Moment vielversprechendsten Zielen der Tumorbekämpfung zählen (Galbán und Duckett 2009, Mehrotra *et al.* 2010, Saleem *et al.* 2013).

4.1 Identifikation eines möglichen Exportsignals in XIAP

Zunächst nur als Mitglied der IAP-Familie beschrieben, konnte XIAP neben seiner anti-apoptotischen Wirkweise mittlerweile mit vielfältigen Funktionen in unterschiedlichen zellulären Prozessen in Verbindung gebracht werden (Srinivasula und Ashwell 2008). So beschäftigten sich immer mehr Forschergruppen mit der detaillierten Untersuchung dieser multifunktionellen Wirkweise von XIAP (Galbán und Duckett 2009). Innerhalb der IAP-Familie wurden nicht nur für Survivin, welches des Weiteren als Mitose-Regulator fungiert, sondern auch für XIAP über die reine Apoptose-Regulation hinausgehende Funktionen beschrieben, wie die Aktivierung von JNK und NF- κ B (Galbán und Duckett 2009, Cheung *et al.* 2013). Im Falle von Survivin konnte die molekulare Basis für seine duale Funktion bereits weitestgehend geklärt werden. Hintergrund ist die Interaktion von Survivin mit dem Exportrezeptor Crm1/ Exportin1 über ein hydrophobes, Leucin-reiches nukleäres Exportsignal (NES). So kann Survivin nicht nur aus dem Zellkern aktiv ins Zytoplasma transportiert werden, sondern über die mitotische Lokalisation des als „*Chromosome Region Maintenance 1*“-Rezeptors auch gezielt an die Zentromere der Chromosomen gebracht werden. So sorgt Survivin als Teil des Chromosomalen Passenger Complex (CPC) über sein NES für dessen Anlagerung an die Chromosomen und somit deren korrekte Verteilung im Verlauf der Mitose (Knauer *et al.* 2007).

Auch wenn ein direkter Zusammenhang mit der Zellteilung für XIAP nicht beschrieben ist, können zelluläre Lokalisationssignale auf vielfältige Weise die Proteinfunktion beeinflussen. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit molekularbiologische und biochemische Analysen durchgeführt, um ein mögliches NES in XIAP zu identifizieren, über welches die vielzähligen Funktionen von XIAP beeinflusst werden könnten.

4.1.1 Lokalisationsanalyse von XIAP

Um erste Hinweise auf das Vorhandensein eines möglichen Exportsignals in der Sequenz von XIAP zu erhalten, wurde ein XIAP-Volllänge-Expressionskonstrukt mit einem C-terminalen GFP-Marker (pc3-XIAP_{FL}-GFP) in Hela-Zellen exprimiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Exportinhibitor LMB behandelt und die Lokalisation des translatierten XIAP-GFP-Konstrukts mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Vergleichbar mit Survivin-GFP lokalisiert XIAP-GFP hauptsächlich im Zytoplasma und nur zu einem geringen Teil im Kern der Zelle. Da die obere Grenze für eine passive Diffusion von Molekülen innerhalb der Zelle bei einem Molekulargewicht von 60 kDa liegt und XIAP in Fusion mit GFP eine Gesamtgröße von ungefähr 80 kDa aufweist, sollten hier passive Diffusionsprozesse keine Rolle spielen (Wang und Brattain 2007).

Nach LMB-Behandlung ist eine signifikante Verlagerung von XIAP-GFP in den Zellkern zu detektieren. Da LMB den Exportrezeptor Crm1 irreversibel inhibiert und damit jeglichen Kernexport über diesen Rezeptor verhindert, kann dies als erster Hinweis auf das Vorhandensein eines Leucin-reichen NES in XIAP gedeutet werden (Kau *et al.* 2004). Diese Vermutung wird durch Survivin als Positivkontrolle und GFP als Negativkontrolle weiter unterstützt. Survivin ist nach LMB-Inkubation in der gesamten Zelle verteilt, wohingegen ohne LMB eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation zu beobachten ist. GFP trägt nachweislich kein Leucin-reiches Exportsignal und reagiert nicht auf LMB (Abb. 14). Die scheinbare Umlagerung nach Zugabe von LMB kann auf der Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) basieren, da es hier zu Schädigungen der Zell-, bzw. Kernmembran und einem Auswaschen des Zytoplasmas kommen kann. Von den Resultaten der Überexpression ausgehend, sollte im Folgenden der Einfluss von LMB auf endogenes XIAP untersucht werden. Um zu klären, welche Zelllinie sich hierfür am besten eignet, wurden zunächst Gesamtzelllysate von diversen Zelllinien (Abb.15) angefertigt und anschließend mittels Western-Blot hinsichtlich der endogenen XIAP-Expression analysiert.

293T- und Hela-Zellen zeigen gefolgt von SK-Mel37 und A431-Zellen die höchste XIAP-Expression. Im Vergleich zu den Survivin_{WT}-GFP stabil transfizierten A431-Zellen lässt sich in parentalen A431-Zellen allerdings nur eine verminderte XIAP-Expression detektieren. Diese Beobachtung ist mit der Funktion von Survivin zu erklären, XIAP zu stabilisieren und vor proteolytischem Abbau zu schützen (Dohi *et al.* 2004). In Vero- sowie in NW-450-Zellen ist nur eine sehr geringe XIAP-Expression nachweisbar. Grund dafür ist möglicherweise, dass es sich bei Vero-Zellen nicht um Tumorzellen handelt, welche durch Hochregulation von Apoptose-Inhibitoren charakterisiert sind. Die niedrige XIAP-Expression in NW-450-Zellen ist nicht genau zu erklären. Hinsichtlich der beschriebenen Ergebnisse und bestehender experimenteller Erfahrungen in der Immunocytochemie (ICC), wurden für weitere Experimente hauptsächlich Hela-Zellen verwendet.

Zur Analyse einer möglichen Umlagerung von endogenem XIAP nach Inhibition des Kernexports durch LMB wurden untransfizierte Hela-Zellen fixiert und die Lokalisation von XIAP mittels Immuncytochemie untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass XIAP sowohl vor als auch nach der LMB-Behandlung zu gleichen Teilen im Zytoplasma und Kern lokalisiert (Abb. 16). Unter der Annahme, dass die homogene XIAP-Färbung im gesamten Zellkörper durch die Permeabilisierung der Zellen zustande kommt, wurde die Färbung ohne Permeabilisierung wiederholt. Als Konsequenz war eine zytoplasmatische XIAP-Akkumulation zu beobachten (Abb. 14). Allerdings war diese auch nach der Behandlung mit LMB noch vorhanden (Abb. 16). Durch die Resultate der Antikörper-Färbung konnte nicht abschließend geklärt werden, ob endogenes XIAP ebenso wie transient überexprimiertes XIAP_{WT}-GFP durch Exportinhibition in seiner Lokalisation beeinflusst wird. Die subzelluläre Position, an der die Antikörper XIAP binden können, schien hier von der Permeabilisierung der Zellen abhängig zu sein. Dies legt nahe, dass entweder ein alternativer Antikörper in der ICC getestet oder das vorliegende Färbeprotokoll optimiert werden muss.

Mittels Zellfraktionierung sollte auf biochemischer Ebene der Einfluss von LMB auf endogenes XIAP verifiziert und mit überexprimierten XIAP bestätigt werden. Dazu wurden sowohl mit XIAP-GFP transfizierte als auch untransfizierte 293T-Zellen mit LMB behandelt. Über die Fraktionierung sollte festgestellt werden, ob sich die Lokalisation des Proteins durch LMB verändert und XIAP hierdurch stärker nukleär akkumuliert. In der Tat konnte nach Inkubation mit LMB sowohl eine verstärkte Kernlokalisation von endogenem als auch von überexprimiertem XIAP nachgewiesen werden. Parallel dazu nahm die Proteinmenge im Zytoplasma ab. Zudem war XIAP auch ohne LMB-Behandlung bereits zu einem geringen Anteil im Nukleus nachweisbar, was möglicherweise auf eine bisher nicht beschriebene Funktion von XIAP im Zellkern hinweisen könnte. Diese Ergebnisse wurden durch die Verwendung der Lamin (Kern)- und GAPDH (Zytoplasma)-Kontrollen unterstützt, da es zu keiner Veränderung der Lokalisation dieser Proteine in Abhängigkeit von LMB kam (Abb. 17). Die Detektion von GAPDH in der Kernfraktion beruht auf einer nicht vollständigen Trennung dieser Fraktion von zytoplasmatischen Proteinen (Abb. 17). Die Verlagerung von XIAP aus dem Zytoplasma in den Zellkern nach Inhibition von Crm1 durch Zugabe von LMB verdeutlicht, dass XIAP nicht mehr exportiert werden kann, und der Exportrezeptor Crm1 damit eine wichtige Rolle beim Kernexport von XIAP einnimmt.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden XIAP_{WT}-GFP- und Crm1-Myc-Konstrukte in Hela-Zellen kotransfiziert und eine mögliche Interaktion der translatierten Fusionsproteine durch Fluoreszenzmikroskopie sowie Ko-Immunpräzipitation analysiert. Obwohl XIAP nach Überexpression nur in geringen Mengen im Kern der Zelle vorhanden war, konnte nach Kotransfektion mit Crm1-Myc eine signifikante Reduktion der nukleären Proteinmenge von XIAP_{WT}-GFP nachgewiesen werden. Eine Überexpression von Crm1 resultierte demnach in

einem verstärkten Kernexport von XIAP_{WT}-GFP (Abb. 18). Eine Interaktion der beiden Proteine konnte mittels Ko-IP weiter verifiziert werden (Abb.19). Da bei der Ko-IP allerdings Gesamtzelllysate verwendet wurden, bleibt weiterhin zu klären, ob es sich hier um eine indirekte oder direkte Interaktion handelt, bei der weitere Faktoren mit involviert sein können. Dieser Aspekt könnte mittels *in vitro*-Transkription/ Translation und anschließend *Pulldown* überprüft werden, da es sich hierbei um ein zellfreies System handelt, bei dem nur die eingesetzten Bindungspartner analysiert werden und die Beteiligung weiterer Kofaktoren oder Adapter-Proteine ausgeschlossen werden kann.

4.1.2 Eingrenzung eines möglichen Exportsignals in XIAP

Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine Interaktion von Crm1 und XIAP hin und zeigen, inwieweit diese die Lokalisation von XIAP in der Zelle beeinflusst. Im nächsten Schritt galt es, die Position des möglichen nukleären Exportsignals in der Proteinsequenz von XIAP zu ermitteln. Im Rahmen der *in silico*-Analyse wurden fünf unterschiedliche Sequenzmotive ausfindig gemacht, welche der Konsensussequenz Leucin-reicher Exportsignale entsprachen (Abb. 20/ Kap. 1.6.1). Die Auswahl der Sequenzmotive richtete sich nach der Anzahl hydrophober Aminosäuren, wobei nicht nur Leucin und Isoleucin, sondern auch Valin, Methionin und Phenylalanin berücksichtigt wurden. Um die prognostizierten nukleären Exportsignale (NES) voneinander zu separieren, wurden zunächst sowohl das N- als auch das C-terminale XIAP-Fragment, welche nach Spaltung durch Caspase-3, -6, -7 und -8 an der Position D₂₄₂ entstehen (Quinn L. Deveraux 1999), in Fusion mit GFP kloniert (Abb. 21). Das N-terminale Fragment umfasst die erste und zweite BIR-Domäne, wohingegen das C-terminale Fragment die dritte BIR-, UBA- und RING-Domäne beinhaltet. Zur Verifizierung der prognostizierten NES wurden anschließend fünf Konstrukte in C-terminaler Fusion mit GFP generiert. Die Teilstücke wurden so gewählt, dass sich in den ersten drei Konstrukten jeweils eine der BIR-Domänen, im vierten die UBA- (Ubiquitin-Assoziierte-Binde-Domäne) und im fünften die RING-Domäne befindet. Neben dem C-terminalen GFP wurden die Konstrukte in einem weiteren Ansatz mit einem zusätzlichen N-terminalen GST fusioniert. Dieses zusätzliche GST sollte zum einen eine ungerichtete Diffusion der Fusionsproteine innerhalb der Zelle verhindern und zum anderen zur Protein-Aufreinigung oder zur Präzipitation in der Ko-IP dienen.

Um einen ersten Anhaltspunkt auf die Position des NES in XIAP zu bekommen und zu untersuchen, inwieweit die Spaltung von XIAP durch die Caspasen-3 und -7 eine Rolle im nukleären Export-Prozess des Proteins spielt, wurden das N- und das C-terminale XIAP-GFP Konstrukt in Hela-Zellen exprimiert. Nach LMB-Inkubation wurde die Lokalisation der translatierten Konstrukte fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Beide Fusionsproteine

lokalisieren im Kern, aber auch geringfügig im Zytoplasma und reagieren nicht auf die LMB-Behandlung (Abb. 22). In Fusion mit einem zusätzlichen GST-*tag* lokalisierten jedoch weder das N- noch das C-terminale XIAP-Fragment im Zellkern. Nach LMB-Behandlung kam es allerdings zu einer deutlichen Kernlokalisierung des N-terminalen Konstrukts (Abb. 23). Die Auswertung dieser Ergebnisse ließ hinsichtlich der Exportinhibition und damit verbundenen Retention des genannten XIAP_{N-Term}-GFP Konstrukts im Zellkern auf ein N-terminales Exportsignal in XIAP schließen. Die sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Lokalisation von XIAP ohne GST-*tag* ließ entweder auf eine ungerichtete Diffusion der Fragmente schließen, welche auf einer stark negativ geladenen Oberflächenstrukturen basieren würde (Colwell *et al.* 2010), oder dem Auftreten einer Wechselwirkung mit einem der Interaktionspartner von XIAP (z.B. XAF1), welche durch das GST-*tag* verhindert wird (Russell *et al.* 2008).

Nachdem die Position der potenziellen NES in der XIAP-Sequenz eingegrenzt werden konnte, wurde die Lokalisation der fünf generierten XIAP-Fragmente nach Inhibition von Crm1 untersucht, um weitere Erkenntnisse über die Aktivität der prognostizierten NES zu gewinnen. Zu Beginn wurden die C-terminal mit GFP markierten Fragmente in Hela-Zellen exprimiert und die Zellen anschließend mit LMB inkubiert. Die nachfolgende Untersuchung ließ keine Veränderung in der Lokalisation der Proteine nach der Behandlung erkennen. Die Fusionsproteine lokalisierten sowohl vor als auch nach Zugabe von LMB verstärkt im Zellkern, waren aber auch in geringen Mengen im Zytoplasma zu detektieren. In Hinblick auf die Molekulargewichte der einzelnen Fragmente, welche einen Wert von jeweils 40 kDa nicht übersteigen, ist dies kein unerwartetes Resultat. Eine ungerichtete Translokation dieser kurzen Proteinfragmente zwischen Nukleus und Zytoplasma kann erfolgen (Rosorius *et al.* 1999). Die Expression der GST-XIAP-GFP₁₋₅ Konstrukte in 293T-Zellen deutete ebenso wenig wie die Resultate der vorherigen Transfektion (XIAP-GFP₁₋₅ Konstrukte) auf ein funktionsfähiges Exportsignal hin. Die Fusionsproteine wurden durch das N-terminal gekoppelte GST an einer willkürlichen Translokation gehindert und waren selbst nach Exportinhibition mittels LMB nur im Zytoplasma zu detektieren (Abb.24 und Abb. 25).

Ausgehend von der visualisierten Lokalisation der XIAP₁₋₅ Konstrukte (Abb. 24 und Abb. 25) ist keine klare Aussage hinsichtlich des Interaktions-Potenzials mit Crm1 und damit verbundenen nukleären Exportaktivität zu treffen. Im ersten Fall (Abb. 24) war die Diffusion durch das zu geringe Molekulargewicht der Proteine noch möglich und im zweiten Fall (Abb. 25) besteht die Vermutung, dass die Proteine nicht in den Zellkern gelangten, um dann wiederum exportiert werden zu können. Diese nicht nachweisbare nukleäre Lokalisation könnte womöglich auf der Tatsache beruhen, dass der XIAP-Antagonist XAF1 mit XIAP über dessen RING-Domäne interagiert und so gemeinsam mit XIAP in den Kern transloziert (Peter Liston und Tamai 2001, Tse *et al.* 2012), was für die Konstrukte 1-4 ohne RING-

Domäne nicht mehr möglich ist. Weshalb das fünfte Fragment trotz einer vorhandenen RING-Domäne nicht transloziert, bleibt unbeantwortet.

Der nicht gewährleistete Zugang zum Zellkern kann mit der Methode der Mikroinjektion umgangen werden, da diese ermöglicht, Proteine direkt in die gewünschten Zellkompartimente zu injizieren. So können die Exporteigenschaften der XIAP₁₋₅-Fragmente verifiziert werden. Die zu injizierenden Proteine wurden zunächst in *E.coli* BL21-Bakterien exprimiert und aufgereinigt (Abb. 26). XIAP_{F3} konnte dabei zwar wie die anderen Fragmente exprimiert werden, ließ sich jedoch nicht aus den Bakterien aufreinigen, was höchstwahrscheinlich an einer Inklusion des Fusionsproteins in Einschlusskörperchen liegt (Baneyx und Mujacic 2004). Unter Verwendung eines stark denaturierenden Lysepuffers könnte das Protein aus den Einschlusskörperchen extrahiert werden. Dabei ist jedoch darauf zu achten, dass das Protein nicht unwiderruflich denaturiert wird.

Die bakteriell exprimierten und aufgereinigten GST-XIAP_{F1-F5}-GFP Proteine (ohne GST-XIAP_{F3}-GFP) wurden jeweils einzeln in den Nukleus von Vero-Zellen mikroinjiziert, und die Lokalisation der Proteine anschließend über einen Zeitraum von 20 h fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Die daraus resultierenden Ergebnisse belegen für die Fragmente 1, 2, 4 und 5 eine Verlagerung in Zytoplasma, welche bereits drei Stunden nach der Injektion zu beobachten war (Abb. 27). Nach weiteren 17 h war eine Gleichverteilung der Proteinmenge zwischen Kern und Zytoplasma nachweisbar. Fragment 5 hingegen ließ nach drei Stunden zwar ebenfalls eine schwache Umlagerung ins Zytoplasma erkennen, die sich aber im weiteren Verlauf der Kinetik nicht verstärkte (Abb. 27). Das Phänomen, dass GST-XIAP_{F5}-GFP zwar translozierte, aber nach drei Stunden keine weitere Umlagerung zeigte, könnte durch dessen Interaktion mit XAF1 über die verbliebene RING-Domäne zu erklären sein. XIAP_{F5} wird, wie auch für XIAP gezeigt (Peter Liston und Tamai 2001, Tse *et al.* 2012), über einen XAF1-vermittelten Import über die vorhandene RING-Domäne in den Kern gebracht und scheint gleichzeitig aus dem Kern exportiert zu werden. Daraus könnte sich die erkennbare Translokation ergeben, welche durch das Entgegenwirken von XAF1 nicht weiter voranschreiten kann. Da die anderen Fragmente keine RING-Domäne besitzen, wird deren Kernexport nicht unterbunden. Dem Ergebnis der Mikroinjektion zur Folge beinhalten sowohl XIAP_{F1} und XIAP_{F2} als auch XIAP_{F5} ein potenzielles NES, was auf ein Vorkommen von multiplen NES in der Sequenz von XIAP hinweisen könnte. Möglicherweise wird der Kernexport von XIAP demnach nicht nur über ein einzelnes Exportsignal, sondern über die Kombination von mehreren schwächeren Signalen vermittelt.

Die Ausnahme bildet XIAP_{F4}, das, obwohl es kein potenzielles NES enthielt, dennoch translozierte, ebenso wie die potenziell NES-tragenden Fragmente (XIAP_{F1}, XIAP_{F2}, XIAP_{F5}). An dieser Stelle ist die UBA-Domäne womöglich von Bedeutung. UBAs können in Proteinen,

die an vielen zellulären Prozessen beteiligt sind, einen wichtigen Beitrag zu deren adäquaten Funktionsweise leisten und nicht nur den Proteinabbau vermitteln (Hicke *et al.* 2005). Beispielsweise wurde belegt, dass die UBA von XIAP einen wichtigen Anteil an der Aktivierung von NF- κ B besitzt (Gyrd-Hansen *et al.* 2008). Somit ist es nicht ausgeschlossen, dass diese UBA einen Einfluss auf den beobachteten Kernexport hat, was jedoch mittels weiterführender Versuche verifiziert werden muss.

Im Allgemeinen scheint es so, dass XIAP im Stande ist, nach der XAF1 vermittelten Kernakkumulation wieder zurück ins Zytoplasma zu gelangen und dort unter anderem als Apoptose-Inhibitor wirken zu können. Dass mehr als nur ein NES für den nukleären Export von Proteinen verantwortlich sein kann, wurde bereits mehrfach nachgewiesen und ist generell auch hier nicht auszuschließen (Huang *et al.* 2013, Hwang *et al.* 2014). Zur Bestätigung der mittels Mikroinjektion erhaltenen Resultate wurden die mit GFP fusionierten XIAP-Konstrukte zusammen mit Crm1 in 293T-Zellen kotransfiziert und anschließend kopräzipitiert. Dieser Versuch bestätigte eine Interaktion zwischen den XIAP-Konstrukten F1, F2, F4 und F5 und dem Exportrezeptor Crm1.

Ebenso schienen XIAP_{F3} und XIAP_{F4} mit Crm1 zu interagieren. Während XIAP_{F4} die stärkste Interaktion der Konstrukte mit Crm1 zeigte, konnte nur eine schwache Bindung von XIAP_{F3} an den Exportrezeptor nachgewiesen werden (Abb. 28). Für XIAP_{F3} könnten neben der Ko-IP die noch ausstehenden Mikroinjektionen einen besseren Einblick in den möglichen Kernexport von XIAP_{F3} liefern, welcher aufgrund des nicht existenten NES nicht stattfinden sollte. Die Interaktion von XIAP_{F4} mit Crm1 basiert zum einen eventuell auf einem unbekannten zwischengeschalteten Adapter-Protein oder einer bisher nicht bekannten Funktion der UBA. Möglicherweise spielt dabei das kurze hydrophobe „MGF-Motiv“ (Tse *et al.* 2011) eine wichtige Rolle und hat in diesem kleinen XIAP-Teilstück einen stärkeren Einfluss als es im Volllänge-XIAP der Fall ist. Mittels IVT und *Pulldown* könnte dies näher analysiert werden. Insgesamt konnten die Versuche jedoch eine mögliche Interaktion zwischen Crm1 und den zuvor mikroinjizierten XIAP-Konstrukten (XIAP_{F1}, XIAP_{F2}, XIAP_{F4}, XIAP_{F5}) belegen.

4.1.3 Funktionsanalyse von XIAP und dessen Interaktionspartnern

Die Kombination unterschiedlicher experimenteller Strategien, namentlich Exportinhibition, Mikroinjektion und Ko-Immunpräzipitation zeigte, dass die XIAP-Lokalisation über die Hemmung von Crm1 mit LMB beeinflusst wird und der Kernexport womöglich von mehreren Exportsignalen in der Sequenz von XIAP vermittelt wird. Inwieweit der Export von XIAP auf der Interaktion von Crm1 mit proteininternen NES oder NES in einem seiner Interaktionspartner beruht, sollte anhand von Kotransfektionen geklärt werden. Da unter den

IAPs publizierten Daten zufolge Survivin bisher einen der potentesten Interaktionspartner von XIAP darstellt (Dohi 2004), wurde XIAP zu Beginn mit Survivin oder dessen exportdefizienten Mutante (Survivin^{NesMt}) in Hela-Zellen Ko-transfiziert und die intrazelluläre Lokalisierung beider Proteine analysiert.

Hieraus ergab sich, dass die Wechselwirkung zwischen XIAP und Survivin weder einen signifikanten Einfluss auf die subzelluläre Verteilung von XIAP noch von Survivin hat. Während die Export-defiziente Survivin-Mutante im Kern akkumulierte, fand sich der Wildtyp im Zytoplasma. Die Akkumulation von Survivin im Nukleus schien eine Abnahme der Menge an zytoplasmatischem XIAP zu induzieren (Abb. 29). Hinsichtlich der dabei gleichbleibenden nukleären Menge von XIAP schien der reduzierende Effekt eher auf dem Verlust der stabilisierenden Funktion von Survivin zu basieren (Dohi *et al.* 2004), was zu einem Abbau von XIAP im Zytoplasma führen könnte und nicht unbedingt auf einen gekoppelten Kernimport oder Kernexport zurückzuführen ist. Nach dem Ausschluss von Survivin als optionalem Transportpartner rückte XAF1 mehr in den Mittelpunkt der Untersuchungen. Im Zusammenhang der von Peter Liston im Jahr 2001 publizierten Daten, welche eine Induktion der Akkumulation von XIAP im Kern über XAF1 postulieren, sollte untersucht werden, ob XAF1 nicht auch gegenteilig wirken und ebenso den nukleären Export von XIAP unterstützen kann. Schließlich ist der XAF1-XIAP-Komplex u.a. für den proteolytischen Abbau von Survivin verantwortlich, welcher nicht im Zellkern abläuft (Arora *et al.* 2007). Dazu wurde zunächst überprüft, ob XAF1 die Voraussetzungen erfüllt, um selbst aktiv über den NPC transportiert zu werden. *In silico*-Sequenzanalysen haben hierbei die Existenz eines Leucinreichen NES in XAF1 belegt (s. Anhang, Abb. 44). Die zelluläre Expression und nachfolgende LMB-Behandlung eines C-terminal mit *mCherry* fusionierten XAF1 konnten die Existenz eines NES weiter bestätigen. Im Gegensatz zur bisherigen Annahme, dass XAF1 ein nukleäres Protein sei (Peter Liston und Tamai 2001), zeigte sich nach dessen Transfektion zunächst eine zytoplasmatische Lokalisation, und erst nach LMB-Zugabe eine nukleäre Akkumulation (Abb. 30). Demnach galt es im nächsten Schritt mittels Kotransfektion und LMB-Inkubation eine potenzielle Wechselwirkung zwischen XIAP und XAF1 aufzudecken.

Tatsächlich wurde anhand der Ko-Expression von XIAP und XAF1 erneut bewiesen, dass zwischen den beiden Proteinen eine Interaktion stattfindet und daraus eine Veränderung in Bezug auf ihre subzelluläre Lokalisation resultiert. Nach Kotransfektion lokalisierten XAF1 sowie XIAP verstärkt im Zellkern, die durch LMB-Inkubation noch gesteigert wird (Abb. 31). Aus diesen Experimenten ergab sich zwar eine Abweichung in der bereits propagierten Lokalisation von XAF1, aber nicht in dessen Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von XIAP (Peter Liston und Tamai 2001). Inwieweit XAF1 im Stande ist, den XIAP-Export zu beeinflussen, muss durch weitere Arbeiten geklärt werden.

4.2 Interaktion von Survivin mit anderen IAPs am Beispiel von Livin

Neben XIAP und Survivin gehört Livin mittlerweile zum Kreis der meist untersuchten IAPs im Bereich der Tumorforschung. Die Expression von Livin ist in zahlreichen Tumorarten nachweislich hochreguliert. Somit stellt Livin ein weiteres Angriffsziel bei der Entwicklung von Krebstherapien dar (Yang *et al.* 2010). Neben seiner Rolle als anti-apoptotisches Protein besitzt Livin ebenso die Fähigkeit, pro-apoptotisch zu wirken. Somit handelt es sich bei diesem IAP-Mitglied nicht nur um einen Inhibitor, sondern mehr um einen Regulator des programmierten Zelltods (Apoptose) (Boaz Nachmias 2003). Es wurde belegt, dass sowohl die α - als auch die β -Form von Livin nach dem Einsetzen der Apoptose von den Caspasen-3 und -7 gespalten wird und sie so ihre pro-apoptotischen Eigenschaften erhalten (Nachmias *et al.* 2007). Dennoch ist eine unnatürlich hohe Expression von Livin mit keiner Zunahme des Zelltods verbunden und dient sogar häufig als Indiz für eine voranschreitende Tumorprogression (Myung *et al.* 2013).

Genauso findet sich in zahlreichen Tumorarten eine starke Überexpression von XIAP und Survivin, wobei letzteres im Stande ist, mit XIAP zu interagieren und somit dessen proteolytischen Abbau zu verhindern (Dohi *et al.* 2004). Von diesem Punkt ausgehend sollte im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob Survivin im Rahmen seiner anti-apoptotischen Funktionen nicht nur XIAP, sondern möglicherweise auch Livin binden und somit dessen Konvertierung in ein pro-apoptotisches Protein verhindern kann.

4.2.1 Lokalisationsanalyse von Livin und Survivin

Um erste Hinweise auf eine potenzielle Interaktion von Survivin und Livin zu erhalten, wurde die subzelluläre Lokalisation von Livin per Immunocytochemie analysiert, nachdem es zum einen mit dem Wildtyp und zum anderen mit der Export-defizienten Mutante von Survivin in Hela-Zellen kotransfiziert wurde. Da die vorliegenden Färbe-Protokolle für die Livin-spezifischen Antikörper bisher nicht etabliert waren, sollte das Protein über ein C-terminal fusionierten Myc-*tag* detektiert werden. Die transfizierten Survivin-Konstrukte trugen ein C-terminales GFP und konnten so mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Zwar färbte der Myc-Antikörper auch zu einem geringen Teil die Zellmembran an, nach Kotransfektion der Livin-Myc und der Survivin-GFP Plasmide war jedoch zu erkennen, dass Livin in Kombination mit Survivin^{NesMT}-GFP stärker im Kern akkumulierte als in Verbindung mit dem wildtypischen Survivin (Abb. 32). Dies konnte als ein erstes Indiz für eine Interaktion der beiden IAPs dienen.

Weiterhin sollte mit Hilfe der Ko-Immunpräzipitation und anschließendem Western-Blot ein mögliches Zusammenspiel von Survivin und Livin genauer überprüft werden. Survivin und Livin wurden dazu in 293T-Zellen kotransfiziert, GFP bzw. XIAP dienten dabei

als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Tatsächlich konnte zwischen Survivin und Livin eine Interaktion nachgewiesen werden, die jedoch nicht so stark schien wie die Bindung von Survivin und XIAP (Abb. 33). Der daraufhin durchgeführte *Pulldown*, mit dem die direkte Bindung zweier Proteine im zellfreien System nachgewiesen werden kann, ließ auf eine indirekte Interaktion von Livin und Survivin schließen. Im Gegensatz zur Positivkontrolle (Survivin und Borealin) konnte hier keine direkte Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 34). Mit Blick auf die Interaktion zwischen Survivin und XIAP, welche direkt über die BIR-Domänen von XIAP stattfindet (Dohi *et al.* 2004), kann nicht ausgeschlossen werden, dass Survivin auch mit Livin über dessen BIR-Domäne interagiert. Somit sollte die Aussagekraft des *Pulldown*-Experiments nochmals überprüft werden.

In weiterführenden Versuchen sollte auch endogenes Livin näher charakterisiert werden. Als Voraussetzung dafür sollte eine (humane) Zelllinie verwendet werden, die eine hohe Livin-Expression aufweist. Daher wurde zunächst die Expression von endogenem Livin in verschiedenen Zelllinien untersucht (Abb. 35).

Innerhalb der getesteten Zelllinien konnte die Expression von Livin auf Proteinebene nur in der Melanom-Zelllinie SK-Mel37 nachgewiesen werden. Bezüglich der Herkunft der verwendeten Zelllinien war nicht zu erwarten, dass Livin nur in den SK-Mel37-Zellen detektierbar war. Bei NW-450 Zellen handelt es sich ebenfalls um eine Melanom-Zelllinie und selbst für Hela- (Zervix), 293T- (Niere) und A431-Zellen (Haut) wurde die Expression von Livin zuvor beschrieben (GeneTex, Yan 2011). Wahrscheinlich wäre in diesem Fall, dass der Livin-Antikörper von den großen Mengen an exprimiertem Livin-Protein in den SK-Mel37-Zellen weggefangen wird, und anschließend nicht mehr ausreichend vorhanden ist, um auch geringe Mengen des Proteins in den anderen Zelllinien zu detektieren. Gegebenenfalls müsste eine sensitivere Nachweismethode etabliert werden (*Real time PCR*), welche zur Detektion sehr schwacher Expressionsintensitäten verwendet werden kann.

Im Hinblick auf die erstmals beschriebene Wechselwirkung von Survivin und Livin sollten im Weiteren die publizierten pro-apoptotischen Spaltprodukte von Livin analysiert werden. Möglicherweise könnte die Livin-Survivin Interaktion die Spaltung von Livin durch die Caspasen verhindern oder die pro-apoptotischen Spaltprodukte binden und so deren Funktion hemmen.

4.2.2 Analyse der trunkierten Formen von Livin

Um die von Nachmias *et al.* 2003 und 2007 beschriebenen Livin-Spaltprodukte bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation und ihrer möglichen Wechselwirkung mit Survivin im Detail untersuchen zu können, wurde zunächst eine Reihe von Livin-Konstrukten

generiert. Dabei handelte es sich um das kurze N-terminale (AS: 1-52) und das lange C-terminale (AS: 53-292) Fragment, welche nach der Spaltung durch Caspase-3 und -7 entstehen. Diese beiden verkürzten Livin-Konstrukte wurden neben dem Volllänge-Livin für die nachfolgenden Experimente jeweils mit N- und C-terminalen GFP- und Myc-tags fusioniert, um ihre Akkumulation in der Zelle verfolgen und einen eventuellen Einfluss des fusionierten tags überprüfen zu können. Zusätzlich zu den GFP-Fusionsproteinen wurden Livin_{WT}-mCherry und ein Myc-Livin_{WT}-GFP Konstrukte kloniert. Die Caspasen spalten Livin N-terminal der BIR-Domäne nach D₅₂, so dass im größeren C-terminalen Spaltstück die BIR- und RING-Domäne vorhanden sind, wohingegen im kleineren N-terminalen Spaltstück bislang keine funktionell relevanten Bereiche bekannt sind (Boaz Nachmias 2003).

Um die Lokalisation der verkürzten Livin-Fragmente zu untersuchen, wurden diese in Hela-Zellen transfiziert und anhand des fusionierten GFP fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der Wildtyp zeigte hauptsächlich eine nukleäre Lokalisation, war aber auch in geringem Ausmaß im Zytoplasma zu finden. Demgegenüber erschien das C-terminale Livin-Fragment distinkter in seiner Lokalisation, da es ausschließlich perinukleär akkumulierte. Das kurze N-terminale Livin-Fragment zeigte eine homogene Verteilung sowohl im Kern als auch im Zytoplasma der Zelle, was wohl auf dessen geringe Größe und der daraus resultierenden Diffusionsfähigkeit beruht. Die hier gezeigte Verteilung der Fusionsproteine ist konform mit der zuvor publizierten Lokalisation (Nachmias *et al.* 2007) und ist somit ein Beweis für die Funktionsfähigkeit der klonierten Konstrukte. Im Hinblick auf die ringförmige Anreicherung des als pro-apoptotisch beschriebenen tLivin_{long}-GFP um den Zellkern sollte im Verlauf der Untersuchungen der exakte Ort der subzellulären Anreicherung identifiziert werden. Hierzu wurden Livin_{WT}-GFP und die dazugehörigen trunkierten Livin-Varianten jeweils gemeinsam mit einem entsprechenden Marker für den Golgi-Apparat bzw. das Endoplasmatische-Retikulum (ER) transfiziert und deren Kolokalisation in der Zelle analysiert.

Für den Livin-Wildtyp und das kurze trunkierte Fragment konnte keine Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat oder dem ER-Marker nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis schließt zwar eine Lokalisation des N-terminalen Spaltstücks am Golgi-Apparat und dem ER aus, liefert jedoch keinen Beweis für deren mangelnde Funktionalität und lässt somit Raum für weitere Untersuchungen. Anders verhält es sich mit der pro-apoptotischen Livin-Form, welche scheinbar nicht wie beschrieben am Golgi-Apparat, sondern am ER akkumuliert (Abb. 38 und Abb. 39) (Nachmias *et al.* 2007). Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse, welche auf eine Lokalisation des C-terminalen Livin-Spaltproduktes am ER hindeuten, lassen sich diverse Erklärungen für dessen postulierte proapoptotische Eigenschaften finden.

Livin gelangt durch die proteolytische Spaltung und der damit verbundenen Lokalisationsveränderung aus dem Zytoplasma ins ER und kann somit im Zytoplasma nicht

mehr anti-apoptotisch wirken. In Abwesenheit von Livin ist dessen Interaktion mit dem zytoplasmatischen Gegenspieler Smac/DIABLO fortan unterbunden, wodurch letzteres nicht mehr ubiquitinyliert werden kann und vor proteolytischem Abbau geschützt ist (Ma *et al.* 2006, Varfolomeev *et al.* 2012). Folglich kann Smac/DIABLO ungehindert XIAP in seiner Funktion als anti-apoptotisches Protein hemmen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch die Ansammlung des Livin-Fragments am ER eine Freisetzung des dort vorhandenen Ca^{2+} induziert wird, was eine Stress-Reaktion in der Zelle zur Folge hätte und den Beginn bzw. ein Voranschreiten der Apoptose herbeiführen würde (Breckenridge *et al.* 2003). Weiterhin kann vermutet werden, dass die Livin-Anhäufung am ER neben der Freisetzung von Ca^{2+} ebenso die Aktivierung der Caspase-12 einleitet, welche als ER-assoziierte Initiator-Caspase beschrieben ist (Nakagawa *et al.* 2000). Eine eventuelle Akkumulation am Golgi-Apparat wie von Nachmias *et al.* 2007 gezeigt könnte allerdings auf eine noch unbekannte Interaktion mit dem dort vorhandenen, hoch konservierten, anti-apoptotischen h-GAAP (*human-Golgi anti-apoptotic protein*) hinweisen (Gubser *et al.* 2007). Die Vielzahl an funktionellen Wegen, auf denen Livin pro-apoptotisch wirken kann, macht dieses IAP zu einem wichtigen Zielprotein für zukünftige Forschungen.

4.2.3 Wirkung von Survivin auf die trunkierten Formen von Livin

Hinsichtlich der mittels Immunfluoreszenz und Ko-IP nachgewiesenen Interaktion von Livin und Survivin sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob diese durch die Livin-Spaltung beeinflusst wird und inwiefern Survivin eine Affinität zu den Spaltprodukten besitzt. Survivin_{WT}-mCherry wurde mit den GFP-fusionierten Spalt-Varianten von Livin und dem Wildtyp in Hela-Zellen kotransfiziert und deren Lokalisation analysiert. Es zeigte sich, dass die Ko-Expression der beiden Proteine keinen Einfluss auf deren subzelluläre Lokalisation hatte. Die perinukleäre Akkumulation von tLivin_{long} blieb ebenso erhalten wie die Verteilung von tLivin_{short} (Abb. 40). Da die Analyse der Kolokalisation keine eindeutige Aussage bezüglich der Interaktion von Survivin mit den Livin-Fragmenten erlaubte, wurden die Livin-Konstrukte mittels Ko-Immunpräzipitation auf eine Wechselwirkung mit Survivin hin untersucht. Auf Grund der vorab gewonnenen Ergebnisse wurden die Untersuchungen auf das C-terminale pro-apoptotische Fragment und den Wildtyp von Livin beschränkt.

Dabei konnte zusätzlich zu der erneuten Bestätigung der Wechselwirkung zwischen Survivin und dem wildtypischen Livin auch eine Bindung von Survivin an tLivin_{long} gezeigt werden, welche wesentlich stärker zu sein schien als die Interaktion von Survivin und dem Volllänge-Livin (Abb. 41). Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf einen weiteren pro-apoptotischen Mechanismus von tLivin_{long}. Ebenso wie der Livin-Wildtyp (Dou *et al.* 2012) bildet tLivin_{long} Homodimere, die im Stande sind, mit Survivin zu interagieren. Durch Livin's

Funktion als E3-Ligase wird Survivin dann ubiquitinyliert und vom Proteasom abgebaut. Daraus geht hervor, dass Livin direkt nach der Spaltung durch die Caspasen-3 und -7 weiterhin einen Einfluss auf die apoptotische Maschinerie besitzt. Dieser wäre dann bereits im Zytoplasma und im späteren Verlauf zusätzlich am ER von Bedeutung. Es werden jedoch weitere Experimente benötigt, um diese Hypothese zu stützen.

4.2.4 Einfluss von Survivin auf die Spaltung von Livin durch Caspase-3

Livin wird in den frühen Stadien der Apoptose von den Effektor-Caspasen -3 und -7 gespalten und wandelt sich daraufhin vom anti- zum pro-apoptotischen Protein (Boaz Nachmias 2003). Neben Livin ist auch XIAP ein Zielprotein der genannten Effektor-Caspasen. Durch die Spaltung wird die anti-apoptotische Wirkweise von XIAP vermindert oder durch Abbau der Spaltprodukte gänzlich ausgeschaltet (Quinn L. Deveraux 1999). In diesem Zusammenhang ist eine wichtige Funktion von Survivin beschrieben. Survivin bindet an XIAP, stabilisiert es und verhindert nicht nur dessen proteolytischen Abbau, sondern ebenfalls die Spaltung durch die Caspasen (Dohi 2004). Davon ausgehend galt es im letzten Teil der Arbeit, einerseits die Beteiligung von Caspase-3 an der Prozessierung von Livin zu bestätigen und andererseits zu analysieren, ob die neu entdeckte Interaktion von Survivin mit Livin, wie auch bei XIAP, einen Effekt auf die Livin-Spaltung hat. Dazu wurde Livin_{WT}-GFP/-mCherry mit Caspase-3_{WT}-GFP in parentalen A431-Zellen und in Survivin_{WT}-GFP konstitutiv exprimierenden A431-Zellen ko-exprimiert und hinsichtlich der subzellulären Lokalisation analysiert.

In den parentalen A431-Zellen war nach der Kotransfektion von Livin und Caspase-3 eine Verlagerung der Caspase-3 in den Zellkern nachweisbar. Dies deutet auf eine aktivierte Form der Caspase-3 hin (Luo *et al.* 2010). Livin zeigte ebenfalls eine phänotypische Veränderung. Wurde es in Abwesenheit exogener Caspase-3 noch nukleär und zytoplasmatisch exprimiert, bildete sich bei Überexpression von Caspase-3 derselbe perinukleäre Phänotyp, der von tLivin_{long} bekannt ist (Abb. 42). Dies belegt deutlich die propagierte Spaltung von Livin durch Caspase-3. Wurde dieselbe Kotransfektion allerdings in Survivin konstitutiv exprimierenden A431-Zellen wiederholt, war im Vergleich zur einzelnen Transfektion keine Veränderung in der Lokalisation der Proteine zu erkennen. Caspase-3 lokalisierte nach wie vor zytoplasmatisch und auch Livin war homogen sowohl im Kern als auch im gesamten Zytoplasma verteilt (Abb. 43). Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass es bei einer stetigen Expression von Survivin nicht zu einer Aktivierung der Caspase-3 und damit zu einer Spaltung von Livin kommt. Survivin scheint hier eine ähnliche Funktion zu erfüllen, wie es bei XIAP der Fall ist. Die Interaktion mit Survivin stabilisiert Livin, unterbindet die Prozessierung in das pro-apoptotische Fragment und verstärkt die anti-apoptotische

Wirkung Livins (Dohi 2004). Dies erklärt auch, weshalb in den meisten Tumorarten nicht nur XIAP und Survivin, sondern ebenso Livin hochreguliert vorliegt (Yang *et al.* 2010). Eine zusätzliche Bestätigung der Ergebnisse könnte durch siRNA-Analysen oder Zellfraktionierungs-Assays geliefert werden. Darüber hinaus könnte ebenfalls geklärt werden, ob Survivin Livin ebenfalls vor der Spaltung durch Caspase-7 bewahren kann (Boaz Nachmias 2003) und welche biologische Funktion das N-terminale Livin-Fragment ausübt.

5. Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Acc. No.	Zugangsnummer
Amp	Ampicilin
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BIR	<i>Baculoviral IAP Repeat</i>
BSA	Rinderserumalbumin
Carb	Carbenicillin
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
Casp	Caspase
Caspase	<i>CysteinyI-aspartate specific protease</i>
c-Myc	Zelluläres Myelocytomatose-Onkogen
CO ₂	Kohlendioxid
CPC	<i>Chromosomal passenger complex</i>
Crm1	<i>Chromosome region maintenance 1</i>
c-Terminus	C-Terminales Ende eines Proteins
Cy3	Carbocyanin 3
DISC	<i>Death inducing signal complex</i>
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	<i>Death-Receptor</i>
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fl	Volllänge
For	<i>Forward</i>
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
Gly	Glycin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O	Dihydrogenmonoxid
HA	<i>Human influenza hemagglutinin</i>
HCl	Hydrogenchlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HtrA2	<i>High Temperature Requirement Protein A2</i>
IAP	<i>Inhibitors of apoptosis protein</i> / Inhibitoren der Apoptose
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ HPO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LMB	Leptomycin B

LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
M	Mol pro Liter
mA	Milliamper
MAC	<i>Mitochondrial apoptosis-induced channel</i>
mCh	<i>mCherry</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
MnCl ₂	Mangandichlorid
MP	Milchpulver
ms	Maus
Myco	Mykoplasmen
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Neo	Neomycin
NES	Nukleäres Export-Signal
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLS	Nukleäres Lokalisations Signal
nm	Nanometer
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
n-Terminus	N-terminales Ende eines Proteins
NUPs	Nukleopore
OD	Optische Dichte
OptiMem	Modifizierte Variante des Eagle Minimum Essential Medium
p	Piko
PARP-1	Poly ADP-ribose polymerase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd

pH	Pondus Hydrogenii
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluorid
PNK	Polynukleotid Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	Resistenz
rb	Kaninchen
Rev	<i>Reverse</i>
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RIPA	Radioimmunpräzipitations Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEAP	Sekretierte embryonische alkalische Phosphatase
Sek.	Sekunde
Ser	Serin
siRNA	Kurze inhibitorische Ribonukleinsäure
SMAC/ DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI</i>
Ss	Einzelstrang
SV40	Simian-Virus 40
T	Tween
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered Salin + 0,1% Tween</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TNFR	<i>Tumor necrosis factor Receptor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
Tyr	Tyrosin
U	Unit (μmol Substrat pro Minute)
üN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volumen
vgl.	Vergleiche
WHO	<i>World Health Organization</i> / Welt Gesundheits Organisation
WT	Wildtyp
XAF1	<i>XIAP associated factor 1</i>
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of apoptosis</i>

5.2 Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

5.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Die häufigsten krankheitsbedingten Todesursachen in Deutschland	5
Abb. 2	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsfällen in Deutschland	6
Abb. 3	Schematische Darstellung der erworbenen Eigenschaften von Krebszellen	9
Abb. 4	Apoptose in der embryonalen Entwicklung	11
Abb. 5	Schematische Darstellung der zellulären Apoptose-Signalwege	13
Abb. 6	Schematische Darstellung der Inhibitoren der Apoptose-Proteinfamilie	17
Abb. 7	Schematische Darstellung der Domänenorganisation von Survivin	19
Abb. 8	Schematische Darstellung der Domänenorganisation von XIAP	21
Abb. 9	Schematische Darstellung der Domänenorganisation von Livin	23
Abb. 10	Schematische Darstellung eines Kernporenkomplex	24
Abb. 11	Schematische Darstellung des nukleo-zytoplasmatischen Transport-Zyklus	26
Abb. 12	Michaelis-Addition von LMB an das Cystein ₅₂₈ von Crm1	30
Abb. 13	Natürlich vorkommende Export-Inhibitoren	31
Abb. 14	Lokalisationsanalyse von XIAP _{WT} -GFP nach Exportinhibition	59
Abb. 15	Expression von endogenem XIAP in unterschiedlichen Zelllinien	60
Abb. 16	Lokalisationsanalyse von endogenem XIAP nach Export-Inhibition	61
Abb. 17	XIAP akkumuliert nach LMB-Behandlung im Zellkern	62
Abb. 18	Die Ko-Expression des Exportrezeptors Crm1 beeinflusst die Lokalisation von XIAP	63
Abb. 19	XIAP und Crm1 zeigen Hinweis auf Interaktion nach Ko-IP	64
Abb. 20	<i>In silico</i> -Sequenzanalyse hinsichtlich potenzieller Exportsignale in XIAP	66
Abb. 21	Schematische Darstellung der XIAP-Expressions-Konstrukte	67
Abb. 22	Export-Inhibition beeinflusst weder die Lokalisation des N- noch des C-terminale XIAP-Konstruktes	68
Abb. 23	GST-XIAP _{N-Term} -GFP akkumuliert nach LMB-Behandlung im Zellkern	69
Abb. 24	Export-Inhibition hat keinen Einfluss auf die Lokalisation der GFP-markierten Deletionskonstrukte XIAP _{F1-F5}	70
Abb. 25	Export-Inhibition hat keinen Einfluss auf die Lokalisation der GFP-markierten GST-GFP fusionierten XIAP-Deletionskonstrukte F1-F5	71
Abb. 26	Bakterielle Expression der GST-XIAP-GFP Konstrukte F1-F5 in E.coli BL21	72
Abb. 27	Exportaktivität der GST-XIAP-GFP-Deletionskonstrukte F1, F2 und F4 nach Mikroinjektion	74

Abb. 28	Die XIAP-GFP Deletionskonstrukte F1, F2 und F4 interagieren mit Crm1	75
Abb. 29	Survivin hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von XIAP	77
Abb. 30	XAF1 akkumuliert erst nach LMB-Behandlung im Zellkern	78
Abb. 31	Lokalisationsanalysen von XIAP _{WT} und XAF1 _{WT} nach Kotransfektion und Export-Inhibition	79
Abb. 32	Die Ko-Expression von Livin mit Survivin _{NESMT} führt zu einer verstärkten Kernlokalisation von Livin	81
Abb. 33	Nachweis der Interaktion von Survivin und Livin mittels Ko-Immunpräzipitation	82
Abb. 34	GST-Pulldown von Survivin _{WT} -GFP mit Livin _{WT} -Myc	83
Abb. 35	Expression von endogenem Livin in unterschiedlichen Zelllinien	84
Abb. 36	Schematische Darstellung der Livin-GFP Expressions-Konstrukte	85
Abb. 37	Lokalisation der trunkierten Livin-GFP Konstrukte	86
Abb. 38	Die Livin Konstrukte akkumulieren nicht am Golgi-Apparat	87
Abb. 39	tLivin _{long} akkumuliert am Endoplasmatische-Retikulum	89
Abb. 40	Die Ko-Expression von Survivin _{WT} und den Livin-Konstrukten führt nicht zu einer wechselseitigen Beeinflussung ihrer Lokalisation	90
Abb. 41	Survivin interagiert am stärksten mit tLivin _{long}	92
Abb. 42	Caspase-3 beeinflusst die Lokalisation von Livin in parentalen A431-Zellen	93
Abb. 43	Caspase-3 hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Livin in Survivin stabilen A431-Zellen	95
Abb. 44	Schematische Darstellung der XAF1/ Isoform1-Proteinsequenz	118
Abb. 45	Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pc3-Caspase-3 _{WT} -GFP-Plasmids	119
Abb. 46	Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pc3-Livin _{WT} -GFP-Plasmids	119
Abb. 47	Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pc3-XAF1 _{WT} -mCherry-Plasmids	120
Abb. 48	Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pc3-XIAP _{WT} -GFP-Plasmids	120
Abb. 49	Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pc3-GST-XIAP _{F1} -GFP-Plasmids	121
Abb. 50	Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pGex-GST-XIAP _{WT} -GFP-Plasmids	121

5.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Apoptose vs. Nekrose	12
Tab. 2	Zielproteine der Caspasen-Spaltung	16
Tab. 3	Exportrezeptoren in höheren Eukaryonten	28
Tab. 4	Verwendete Kits	33
Tab. 5	Antibiotika für Bakterien	34
Tab. 6	Primärantikörper	34
Tab. 7	Sekundärantikörper	35
Tab. 8	PCR-Primer	35
Tab. 9	Primer für Oligoannealing	36
Tab. 10	Primer für Sequenzanalyse	37
Tab. 11	Klonierungsvektoren	37
Tab. 12	Eukaryontische Expressionsvektoren	37
Tab. 13	Prokaryontische Expressionsvektoren	39
Tab. 14	Bakterienstämme	40
Tab. 15	Zelllinien	41
Tab. 16	Kultivierungsmedien und Medienzusätze für eukaryontische Zelllinien	43
Tab. 17	Ansatz zur Herstellung von Polyacrylamidgelen	52

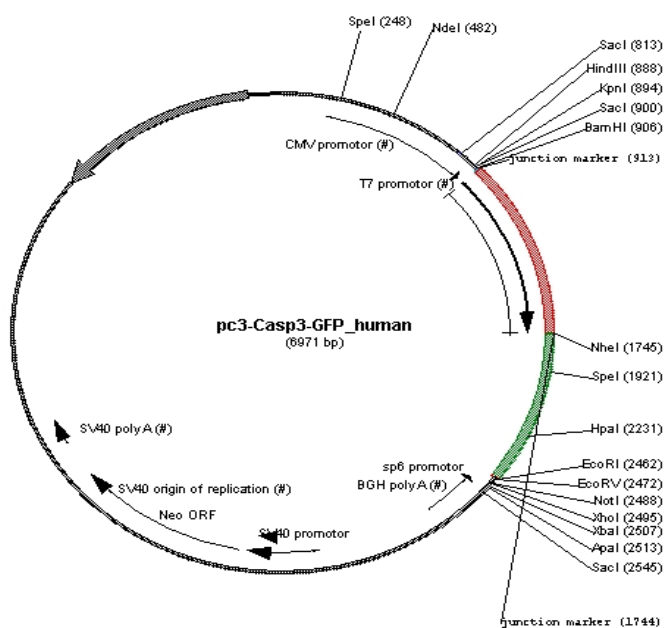
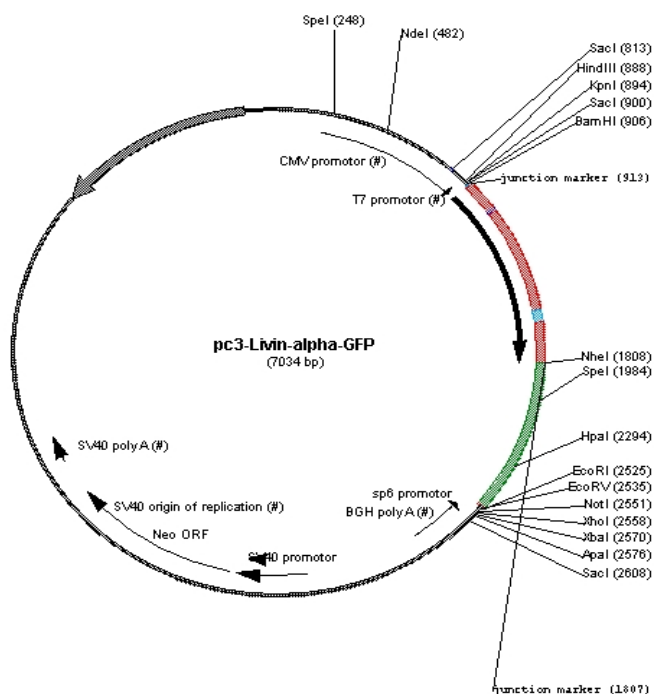
5.5 XAF1 Proteinsequenz/ Isoform 1

10	20	30	40	50	60
MEGDFSVCRN	CKRHVVSANF	TLHEAYCLRF	LVLCPCEEEP	VPKETMEEHC	KLEHQQVGCT
70	80	90	100	110	120
MCQQSMQKSS	LEFHKANECQ	ERPVECKFCK	LDMQLSKLEL	HESYCGSRTE	LCQGCQGFIM
130	140	150	160	170	180
HRMLAQHRDV	CRSEQAQLGK	GERISAPERE	IYCHYCNQMI	PENKYFHMMG	KCCPDSEFKK
190	200	210	220	230	240
HFPVGNPEIL	PSSLPSQAAE	NQTSTMEKDV	RPKTRSINRF	PLHSESSSKK	APRSKNKTLD
250	260	270	280	290	300
PLLMSEPKPR	TSSPRGDKAA	YDILRRCSQC	GILLPLPILN	QHQEKCRWLA	SSKGKQVRNF

Abb. 44 – Schematische Darstellung der XAF1/ Isoform1-Proteinsequenz

Gezeigt ist die Proteinsequenz von XAF1/ Isoform1 wobei in Rot das bisher nicht beschriebene potenzielle nukleäre Exportsignal markiert ist.

5.6 Plasmid-Karten

Abb. 45 – Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pc3-Caspase-3^{WT}-GFP-PlasmidsAbb. 46 – Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pc3-Livin^{WT}-GFP-Plasmids

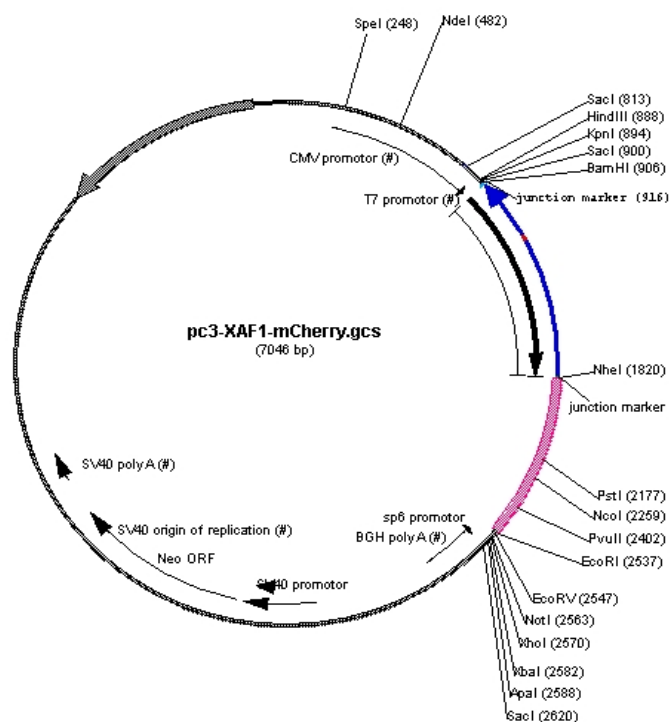


Abb. 47 – Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pc3-XAF1_{WT}-*mCherry*-Plasmids

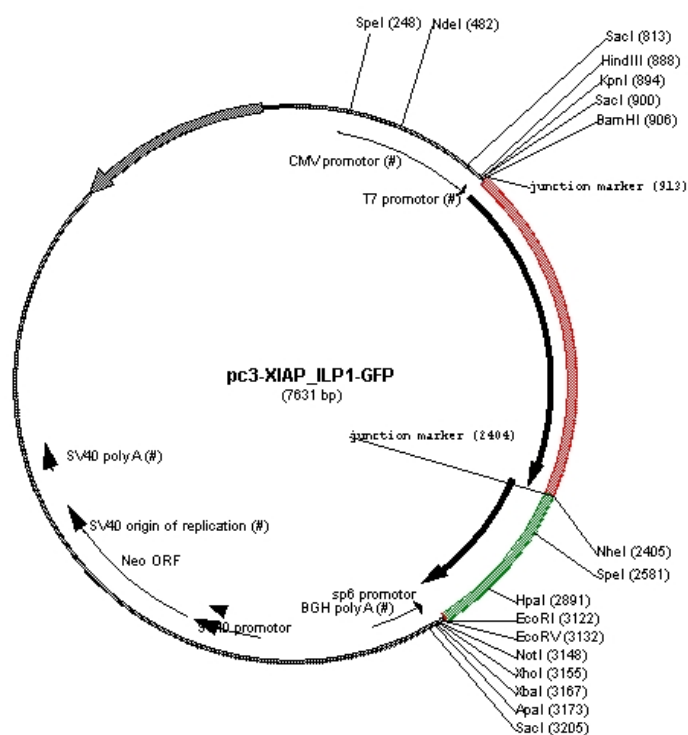


Abb. 48 – Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pc3-XIAP_{WT}-GFP-Plasmids

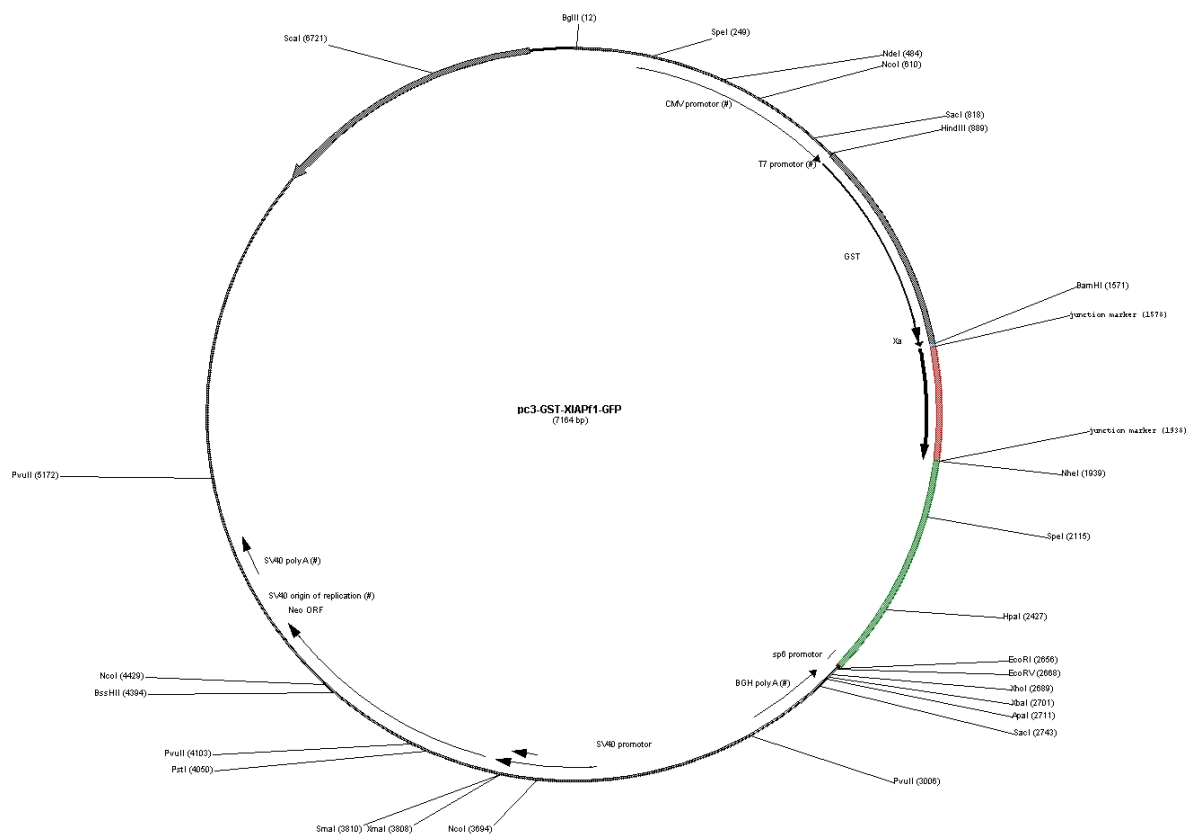


Abb. 49 – Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pc3-GST-XIAP_{F1}-GFP-Plasmids

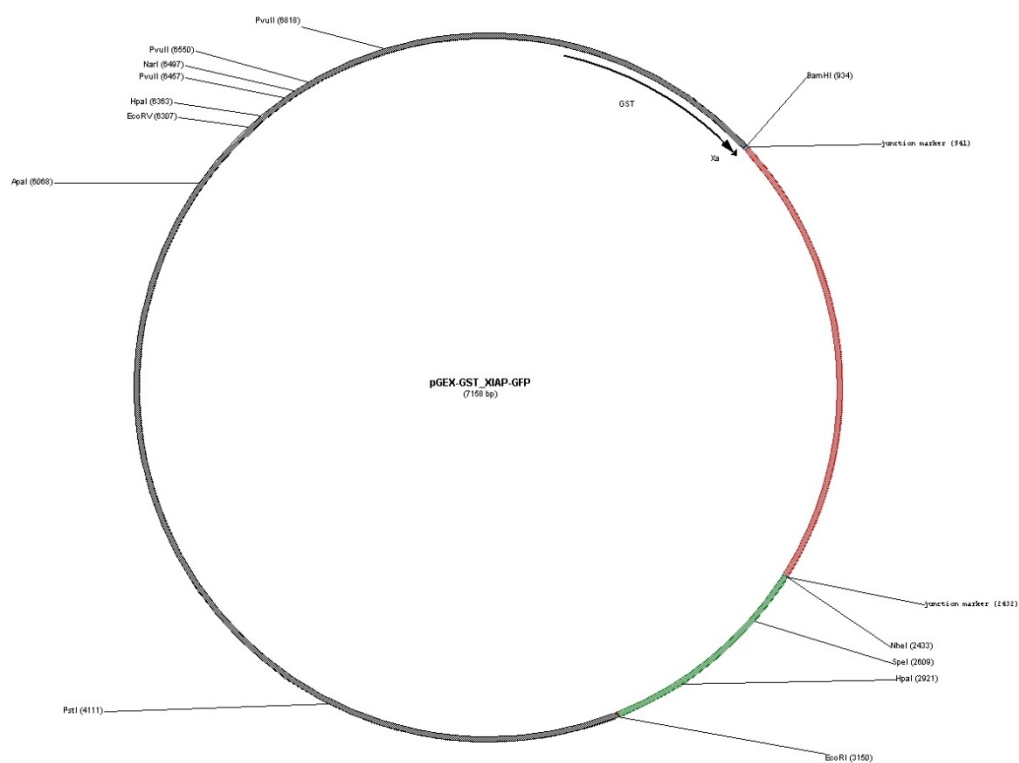


Abb. 50 – Schematische Darstellung eines in dieser Arbeit klonierten pGex-GST-XIAP_{WT}-GFP-Plasmids

5.7 Ncbi Gene Accession Numbers der verwendeten Sequenzen

NAME	ACCESSION NUMBER
Caspase-3	NM_004346.3
Livin-β	NM_022161.3
Survivin	NM_001168.2
XAF1	NM_017523.3
XIAP	NM_001167.3

5.8 Veröffentlichungen

Overexpression of the catalytically impaired Taspase1T234V or Taspase1D233A variants does not have a dominant negative effect in t(4;11) leukemia cells.

Bier C., **Hecht R.**, Kunst L., Scheiding S., Wünsch D., Goesswein D., Schneider, G., Krämer, O.H., Knauer S.K., Stauber R.H.

PLOSONe 2012, 7(5):e34142. doi: 10.1371/journal.pone.0034142. Epub 2012 May 3

Functional characterization of novel mutations affecting Survivin (BIRC5)-mediated therapy resistance in head and neck cancer patients.

Knauer S.K., Unruhe B., Karczewski S., **Hecht R.**, Fetz V., Bier C., Friedl S., Wollenberg B., Pries R., Habtemichael N., Heinrich U.R., Stauber R.H. Human Mutation 2013, 34(2):395-404. doi: 10.1002/humu.22249. Epub 2012 Dec 20

Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology.

Tenzer S., Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., **Hecht R.**, Schlenk F., Fischer D., Kiouptsi K., Reinhardt C., Landfester K., Schild H., Maskos M., Knauer S.K., Stauber R.H.

Nature Nanotechnology 2013, 8(10):772-81. doi: 10.1038/nnano.2013.181. Epub 2013 Sep 22

5.9 Vorträge

- R. Hecht “Livin and it’s dual role in apoptosis” – BIOME-Seminarreihe August 2012
- R. Hecht “IAP crosstalk in apoptosis” – ZMB: Lunch-Seminar November 2012
- R. Hecht “IAP crosstalk in apoptosis” – 2nd Annual BIOME Retreat November 2012
- R. Hecht “IAP crosstalk in apoptosis” – Gastvortrag an der Paris-Lodron Universität Salzburg April 2013
- R. Hecht „IAP crosstalk in apoptosis“ – BIOME-Seminarreihe September 2013

5.10 Poster

1st Annual BIOME Retreat Dormagen/ Zons, Mai 2011:

Molecular Analysis And Targeting Of The Cytoprotective NO/ Survivin-Axis In Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs)

Rouven Hecht, Sarah Tillmann, Lena Kunst, Shirley Knauer – ZMB, Molekularbiologie II, Universität Duisburg Essen

3rd Annual BIOME Retreat Essen, Dezember 2013:

The Quest For XIAP’s NES

Rouven Hecht, Tim Nierhaus, Shirley Knauer – ZMB, Molekularbiologie II, Universität Duisburg Essen

7th Federation of European Neurosciences Societies (FENS) Forum Juni 2010 - Amsterdam

Changes in PTP-NP/Phogrin expression lead to alterations in neurite growth

Sczegan T., Klausmeyer A. (1), **Hecht R.** (2), Conrad R. (1) & Wiese S. (1) - (1) Molekulare Zellbiologie, Ruhr-Universität Bochum, Deutschland; (2) ZMB, Molekularbiologie II, Universität Duisburg Essen, Germany

5.11 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir in den letzten Jahren zur Seite standen und mich durch meine Promotion begleitet haben. Ihre aufmunternden, motivierenden und manchmal auch mahnenden Worte brachten mich dazu stets fleißig zu sein!

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Shirley Knauer für die Vergabe des interessanten Themas sowie die Möglichkeit meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Ich danke Ihr, für die all umfassende Hilfsbereitschaft und die stete Gesprächsbereitschaft, da ohne ihren wertvollen akademischen Rat diese Arbeit nicht entstanden wäre. Vielen Dank, für das mir entgegengebrachte Vertrauen, sowie nicht zuletzt auch für private Gespräche, durch die sie zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter wurde!

Herrn Prof. Dr. med. Johannes Schulte danke ich vielmals für die Übernahme der Zweitkorrektur!

Vergessen sind auch nicht meine Labor-Mitstreiterinnen, die mir jederzeit als Ansprechpartner zu Seite standen und mein Forschungsprojekt durch ihre Ideen, ihre Anregungen und ihre konstruktive Kritik vorantrieben. Des Weiteren möchte ich mich für das ausgesprochen positive Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft bedanken. Darüber hinaus danke ich Tim Nierhaus, der durch seinen hohen Einsatz zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen hat. Ebenso möchte ich Karolin Jänen für ihre stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor danken!

Der AG-Gunzer danke ich für die freundschaftliche Behandlung und unterstützenden Worte während der Zeit meiner Schreibphase und literarischen Selbstfindung!

Eine herausragende Rolle nehme in jeglicher Hinsicht meine Freunde und meine Familie ein, ohne Ihre liebevolle Unterstützung wäre diese Arbeit sicher nicht zu dem geworden, was sie heute ist! Der größte Dankt gilt meinen Eltern, die in allen Bereichen den Grundstein für meinen Weg gelegt haben, sowie für ihre finanzielle und moralische Unterstützung und Ihren stetigen Rückhalt!

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Miriam, die sich unzählige Tage mit meinen wirren Theorien rumschlagen und oft auf mich verzichten musste wenn es im Labor etwas stressig wurde. Ihre Nachsicht und ihr Beistand waren mit die wichtigsten Beiträge zu dieser Arbeit, Danke dafür!

5.12 Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Funktionelle Charakterisierung potenzieller Exportsignale und Interaktionen innerhalb der IAP-Familie“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Rouven Hecht befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegeben Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

5.13 Lebenslauf (CV)

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Abd-Elrahman, I., K. Hershko, T. Neuman, B. Nachmias, R. Perlman and D. Ben-Yehuda (2009). *The Inhibitor of Apoptosis Protein Livin (ML-IAP) Plays a Dual Role in Tumorigenicity*. Cancer Research **69**(13): 5475-5480.

Adams, J. M. and S. Cory (2007). *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene **26**(9): 1324-1337.

Alberts, B. (2012). Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie.

Alenzi, F. Q., M. Lotfy and R. Wyse (2010). *Swords of cell death: caspase activation and regulation*. Asian Pac J Cancer Prev **11**(2): 271-280.

Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Yuan (1996). *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell **87**(2): 171.

Altieri, Dario C. (2010). *Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms*. Biochemical Journal **430**(2): 199-205.

Andersen, P., B. B. Kragelund, A. N. Olsen, F. H. Larsen, N. H. Chua, F. M. Poulsen and K. Skriver (2004). *Structure and biochemical function of a prototypical Arabidopsis U-box domain*. J Biol Chem **279**(38): 40053-40061.

Arora, V., H. H. Cheung, S. Plenchette, O. C. Micali, P. Liston and R. G. Korneluk (2007). *Degradation of Survivin by the X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP)-XAF1 Complex*. Journal of Biological Chemistry **282**(36): 26202-26209.

Ashhab, Y., A. Alian, A. Polliack, A. Panet and D. Ben Yehuda (2001). *Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern*. FEBS Lett **495**(1-2): 56-60.

Baneyx, F. and M. Mujacic (2004). *Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli*. Nat Biotechnol **22**(11): 1399-1408.

Bauler, L. D., C. S. Duckett and M. X. O'Riordan (2008). *XIAP regulates cytosol-specific innate immunity to Listeria infection*. PLoS Pathog **4**(8): e1000142.

Bischoff, F. R. and D. Gorlich (1997). *RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors*. Febs Letters **419**(2-3): 249-254.

Boatright, K. M., M. Renatus, F. L. Scott, S. Sperandio, H. Shin, I. M. Pedersen, J. E. Ricci, W. A. Edris, D. P. Sutherlin, D. R. Green and G. S. Salvesen (2003). *A unified model for apical caspase activation*. Mol Cell **11**(2): 529-541.

Boaz Nachmias, Y. A., Vered Bucholtz, et al. (2003). *Caspase-Mediated Cleavage Converts Livin from an Antiapoptotic to a Proapoptotic Factor : Implications for Drug-Resistant Melanoma*. Cancer Research **63**: 6340-6349.

Bogerd, H. P., R. A. Fridell, R. E. Benson, J. Hua and B. R. Cullen (1996). *Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay*. Mol Cell Biol **16**(8): 4207-4214.

Bonazzi, S., S. Guttinger, I. Zemp, U. Kutay and K. Gademann (2007). *Total synthesis, configuration, and biological evaluation of anguinomycin C*. Angew Chem Int Ed Engl **46**(45): 8707-8710.

- Bratton, S. B. and G. S. Salvesen (2010). *Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome*. J Cell Sci **123**(Pt 19): 3209-3214.
- Breckenridge, D. G., M. Germain, J. P. Mathai, M. Nguyen and G. C. Shore (2003). *Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways*. Oncogene **22**(53): 8608-8618.
- Brentnall, M., L. Rodriguez-Menocal, R. L. De Guevara, E. Cepero and L. H. Boise (2013). *Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis*. BMC Cell Biol **14**: 32.
- Budd, R. C. (2002). *Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis*. Journal of Clinical Investigation **109**(4): 437-441.
- Cheung, C. H. A., C. C. Huang, F. Y. Tsai, J. Y. C. Lee, S. M. Cheng, Y. C. Chang, Y. C. Huang, S. H. Chen and J. Y. Chang (2013). *Survivin - biology and potential as a therapeutic target in oncology*. Oncotargets and Therapy **6**: 1453-1462.
- Clem, R. J., M. Fechheimer and L. K. Miller (1991). *Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells*. Science **254**(5036): 1388-1390.
- Colotta, F., P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda and A. Mantovani (2009). *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*. Carcinogenesis **30**(7): 1073-1081.
- Colwell, L. J., M. P. Brenner and K. Ribbeck (2010). *Charge as a Selection Criterion for Translocation through the Nuclear Pore Complex*. Plos Computational Biology **6**(4).
- Coumar, M. S., F. Y. Tsai, J. R. Kanwar, S. Sarvagalla and C. H. Cheung (2013). *Treat cancers by targeting survivin: just a dream or future reality?* Cancer Treat Rev **39**(7): 802-811.
- Croce, C. M. (2008). *Oncogenes and cancer*. N Engl J Med **358**(5): 502-511.
- Cronshaw, J. M., A. N. Krutchinsky, W. Zhang, B. T. Chait and M. J. Matunis (2002). *Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex*. J Cell Biol **158**(5): 915-927.
- Crook, N. E., R. J. Clem and L. K. Miller (1993). *An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif*. J Virol **67**(4): 2168-2174.
- D'Angelo, M. A. and M. W. Hetzer (2008). *Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes*. Trends Cell Biol **18**(10): 456-466.
- Danaei, G., S. Vander Hoorn, A. D. Lopez, C. J. L. Murray, M. Ezzati and C. R. A. Collab (2005). *Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors*. Lancet **366**(9499): 1784-1793.
- Degtarev, A., M. Boyce and J. Y. Yuan (2003). *A decade of caspases*. Oncogene **22**(53): 8543-8567.
- Dejean, L. M., S. Martinez-Caballero and K. W. Kinnally (2006). *Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis?* Cell Death and Differentiation **13**(8): 1387-1395.
- Denning, D. P. and M. F. Rexach (2007). *Rapid evolution exposes the boundaries of domain structure and function in natively unfolded FG nucleoporins*. Mol Cell Proteomics **6**(2): 272-282.

Dohi, T. (2004). *An IAP-IAP Complex Inhibits Apoptosis*. Journal of Biological Chemistry **279**(33): 34087-34090.

Dohi, T., K. Okada, F. Xia, C. E. Wilford, T. Samuel, K. Welsh, H. Marusawa, H. Zou, R. Armstrong, S. Matsuzawa, G. S. Salvesen, J. C. Reed and D. C. Altieri (2004). *An IAP-IAP complex inhibits apoptosis*. J Biol Chem **279**(33): 34087-34090.

Dong, X., A. Biswas, K. E. Suel, L. K. Jackson, R. Martinez, H. Gu and Y. M. Chook (2009). *Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1*. Nature **458**(7242): 1136-1141.

Dou, H., L. Buetow, G. J. Sibbet, K. Cameron and D. T. Huang (2012). *BIRC7–E2 ubiquitin conjugate structure reveals the mechanism of ubiquitin transfer by a RING dimer*. Nature Structural & Molecular Biology **19**(9): 876-883.

Eckelman, B. P., G. S. Salvesen and F. L. Scott (2006). *Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family*. EMBO Rep **7**(10): 988-994.

Evan, G. and T. Littlewood (1998). *A matter of life and cell death*. Science **281**(5381): 1317-1322.

Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell **61**(5): 759-767.

Ferlay J, S. I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. (2013). *Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. IARC CancerBase **11**.

Ferrando-May, E. (2005). *Nucleocytoplasmic transport in apoptosis*. Cell Death and Differentiation **12**(10): 1263-1276.

Fesik, S. W. and Y. Shi (2001). *Structural biology. Controlling the caspases*. Science **294**(5546): 1477-1478.

Fetz, V., S. K. Knauer, C. Bier, J. P. von Kries and R. H. Stauber (2009). *Translocation Biosensors - Cellular System Integrators to Dissect CRM1-Dependent Nuclear Export by Chemicogenomics*. Sensors (Basel) **9**(7): 5423-5445.

Fiandalo, M. V. and N. Kyprianou (2012). *Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis*. Exp Oncol **34**(3): 165-175.

Fischer, U., R. U. Janicke and K. Schulze-Osthoff (2003). *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates*. Cell Death and Differentiation **10**(1): 76-100.

Fornerod, M. and M. Ohno (2002). *Exportin-mediated nuclear export of proteins and ribonucleoproteins*. Results Probl Cell Differ **35**: 67-91.

Franklin, M. C., S. Kadkhodayan, H. Ackerly, D. Alexandru, M. D. Distefano, L. O. Elliott, J. A. Flygare, G. Mausisa, D. C. Okawa, D. Ong, D. Vucic, K. Deshayes and W. J. Fairbrother (2003). *Structure and function analysis of peptide antagonists of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP)*. Biochemistry **42**(27): 8223-8231.

Frey, S. and D. Gorlich (2009). *FG/FxFG as well as GLFG repeats form a selective permeability barrier with self-healing properties*. EMBO J **28**(17): 2554-2567.

Futreal, P. A., L. Coin, M. Marshall, T. Down, T. Hubbard, R. Wooster, N. Rahman and M. R. Stratton (2004). *A census of human cancer genes*. Nat Rev Cancer **4**(3): 177-183.

G.Korneluk, M. H. a. R. (2001). *XIAP, the guardian angel*. Nature Reviews Molecular Cell Biology **2**.

Galbán, S., G. F. Brady and C. S. Duckett (2008). *Caspases and IAPs: A Dance of Death Ensures Cell Survival*. Molecular Cell **32**(4): 462-463.

Galbán, S. and C. S. Duckett (2009). *XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling*. Cell Death and Differentiation **17**(1): 54-60.

Gazzaniga, P., A. Gradilone, L. Giuliani, O. Gandini, I. Silvestri, I. Nofroni, G. Sacconi, L. Frati and A. M. Agliano (2003). *Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer*. Ann Oncol **14**(1): 85-90.

GeneTex, I. from <http://www.genetex.com/Livin-antibody-GTX114132.html>.

Gerth, K., D. Schummer, G. Hofle, H. Irschik and H. Reichenbach (1995). *Ratjadon: a new antifungal compound from Sorangium cellulosum (myxobacteria) production, physio-chemical and biological properties*. J Antibiot (Tokyo) **48**(9): 973-976.

Green, D. R. (1998). *Apoptotic pathways: the roads to ruin*. Cell **94**(6): 695-698.

Gubser, C., D. Bergamaschi, M. Hollinshead, X. Lu, F. J. van Kuppeveld and G. L. Smith (2007). *A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes*. PLoS Pathog **3**(2): e17.

Güttler, T. and D. Görlich (2011). *Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective*. EMBO J **30**(17): 3457-3474.

Güttler, T., T. Madl, P. Neumann, D. Deichsel, L. Corsini, T. Monecke, R. Ficner, M. Sattler and D. Görlich (2010). *NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1*. Nat Struct Mol Biol **17**(11): 1367-1376.

Gyrd-Hansen, M., M. Darding, M. Miasari, M. M. Santoro, L. Zender, W. Xue, T. Tenev, P. C. da Fonseca, M. Zvelebil, J. M. Bujnicki, S. Lowe, J. Silke and P. Meier (2008). *IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis*. Nat Cell Biol **10**(11): 1309-1317.

Hajdu, S. I. (2011). *A note from history: landmarks in history of cancer, part 1*. Cancer **117**(5): 1097-1102.

Hajdu, S. I. (2012). *A note from history: landmarks in history of cancer, part 3*. Cancer **118**(4): 1155-1168.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). *The hallmarks of cancer*. Cell **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell **144**(5): 646-674.

Henze, K. and W. Martin (2003). *Evolutionary biology: essence of mitochondria*. Nature **426**(6963): 127-128.

Hicke, L., H. L. Schubert and C. P. Hill (2005). *Ubiquitin-binding domains*. Nat Rev Mol Cell Biol **6**(8): 610-621.

Hofer-Warbinek, R., J. A. Schmid, C. Stehlik, B. R. Binder, J. Lipp and R. de Martin (2000). *Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1*. J Biol Chem **275**(29): 22064-22068.

Hofmann, K., P. Bucher and J. Tschopp (1997). *The CARD domain: a new apoptotic signalling motif*. Trends Biochem Sci **22**(5): 155-156.

Holland, F. (2000). Holland-Frei: Cancer Medicine, 5th edition. J. Edited by Robert C Bast, MD, Donald W Kufe, MD, Raphael E Pollock, MD, PhD, Ralph R Weichselbaum, MD, James F Holland, MD, ScD (hc), and Emil Frei, III, MD.

Hotchkiss, R. S. and D. W. Nicholson (2006). *Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis*. Nat Rev Immunol **6**(11): 813-822.

Huang, S., J. Chen, Q. Chen, H. Wang, Y. Yao, J. Chen and Z. Chen (2013). *A second CRM1-dependent nuclear export signal in the influenza A virus NS2 protein contributes to the nuclear export of viral ribonucleoproteins*. J Virol **87**(2): 767-778.

Hwang, I. S., S. U. Woo, J. W. Park, S. K. Lee and H. Yim (2014). *Two nuclear export signals of Cdc6 are differentially associated with CDK-mediated phosphorylation residues for cytoplasmic translocation*. Biochim Biophys Acta **1843**(2): 223-233.

Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.

Jessenberger, V. and S. Jentsch (2002). *Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol **3**(2): 112-121.

Joazeiro, C. A., S. S. Wing, H. Huang, J. D. Levenson, T. Hunter and Y. C. Liu (1999). *The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase*. Science **286**(5438): 309-312.

Kalesse, M., M. Christmann, U. Bhatt, M. Quitschalle, E. Claus, A. Saeed, A. Burzlaff, C. Kasper, L. O. Haustedt, E. Hofer, T. Scheper and W. Beil (2001). *The chemistry and biology of ratjadone*. Chembiochem **2**(9): 709-714.

Kashkar, H. (2010). *X-linked Inhibitor of Apoptosis: A Chemoresistance Factor or a Hollow Promise*. Clinical Cancer Research **16**(18): 4496-4502.

Kasper, D. L. a. Z., D.F. (2001). Gas gangrene, antibiotic associated colitis, and other Clostridial infections.

Kau, T. R., J. C. Way and P. A. Silver (2004). *Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention*. Nat Rev Cancer **4**(2): 106-117.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer **26**(4): 239-257.

Kichev, A., C. I. Rousset, A. A. Baburamani, S. W. Levison, T. L. Wood, P. Gressens, C. Thornton and H. Hagberg (2014). *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) signaling and cell death in the immature central nervous system after hypoxia-ischemia and inflammation*. J Biol Chem.

Knauer, S. K., C. Bier, P. Schlag, J. Fritzmann, W. Dietmaier, F. Rodel, L. Klein-Hitpass, A. F. Kovacs, C. Doring, M. L. Hansmann, W. K. Hofmann, M. Kunkel, C. Brochhausen, K. Engels, B. M. Lippert, W. Mann and R. H. Stauber (2007). *The survivin isoform survivin-3B is*

cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. Cell Cycle **6**(12): 1502-1509.

Knauer, S. K., G. Carra and R. H. Stauber (2005). *Nuclear export is evolutionarily conserved in CVC paired-like homeobox proteins and influences protein stability, transcriptional activation, and extracellular secretion.* Molecular and Cellular Biology **25**(7): 2573-2582.

Knauer, S. K., W. Mann and R. H. Stauber (2007). *Survivin's dual role: an export's view.* Cell Cycle **6**(5): 518-521.

Koster, M., S. Lykke-Andersen, Y. A. Elnakady, K. Gerth, P. Washausen, G. Hofle, F. Sasse, J. Kjems and H. Hauser (2003). *Ratjadones inhibit nuclear export by blocking CRM1/exportin 1.* Exp Cell Res **286**(2): 321-331.

Kotera, I., T. Sekimoto, Y. Miyamoto, T. Saiwaki, E. Nagoshi, H. Sakagami, H. Kondo and Y. Yoneda (2005). *Importin alpha transports CaMKIV to the nucleus without utilizing importin beta.* Embo Journal **24**(5): 942-951.

Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Koths, D. J. Kwiatkowski and L. T. Williams (1997). *Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis.* Science **278**(5336): 294-298.

Krebshilfe, D. (2013). from <http://www.krebshilfe.de/wir-informieren/ueber-krebs/krebszahlen.html>.

Krelin, Y., L. Zhang, T. B. Kang, E. Appel, A. Kovalenko and D. Wallach (2008). *Caspase-8 deficiency facilitates cellular transformation in vitro.* Cell Death Differ **15**(9): 1350-1355.

Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida and S. Horinouchi (1999). *Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(16): 9112-9117.

Kumar, S. (2007). *Caspase function in programmed cell death.* Cell Death and Differentiation **14**(1): 32-43.

Kutay, U., F. R. Bischoff, S. Kostka, R. Kraft and D. Gorlich (1997). *Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor.* Cell **90**(6): 1061-1071.

Kutay, U., G. Lipowsky, E. Izaurralde, F. R. Bischoff, P. Schwarzmaier, E. Hartmann and D. Gorlich (1998). *Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor.* Mol Cell **1**(3): 359-369.

la Cour, T., R. Gupta, K. Rapacki, K. Skriver, F. M. Poulsen and S. Brunak (2003). *NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals.* Nucleic Acids Res **31**(1): 393-396.

la Cour, T., L. Kierner, A. Molgaard, R. Gupta, K. Skriver and S. Brunak (2004). *Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals.* Protein Eng Des Sel **17**(6): 527-536.

Li, H., H. Zhu, C. J. Xu and J. Yuan (1998). *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.* Cell **94**(4): 491-501.

Lim, R. Y., K. S. Ullman and B. Fahrenkrog (2008). *Biology and biophysics of the nuclear pore complex and its components.* Int Rev Cell Mol Biol **267**: 299-342.

- Lorick, K. L., J. P. Jensen, S. Fang, A. M. Ong, S. Hatakeyama and A. M. Weissman (1999). *RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11364-11369.
- Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, J. Abraham, T. Adair, R. Aggarwal, S. Y. Ahn, M. Alvarado, H. R. Anderson, L. M. Anderson, K. G. Andrews, C. Atkinson, L. M. Baddour, S. Barker-Collo, D. H. Bartels, M. L. Bell, E. J. Benjamin, et al. (2012). *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet **380**(9859): 2095-2128.
- Luo, M., Z. Y. Lu, H. Sun, K. H. Yuan, Q. C. Zhang, S. Meng, F. X. Wang, H. C. Guo, X. F. Ju, Y. Q. Liu, T. Ye, Z. G. Lu and Z. H. Zhai (2010). *Nuclear entry of active caspase-3 is facilitated by its p3-recognition-based specific cleavage activity*. Cell Research **20**(2): 211-222.
- Ma, L., Y. Huang, Z. Song, S. Feng, X. Tian, W. Du, X. Qiu, K. Heese and M. Wu (2006). *Survivin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway*. Cell Death and Differentiation **13**(12): 2079-2088.
- MacFarlane, M. (2003). *TRAIL-induced signalling and apoptosis*. Toxicology Letters **139**(2-3): 89-97.
- Mantovani, A. and M. A. Pierotti (2008). *Cancer and inflammation: a complex relationship*. Cancer Lett **267**(2): 180-181.
- Mattson, M. P. and S. L. Chan (2003). *Calcium orchestrates apoptosis*. Nat Cell Biol **5**(12): 1041-1043.
- Matunis, M. J., J. A. Wu and G. Blobel (1998). *SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex*. Journal of Cell Biology **140**(3): 499-509.
- Mayo-Clinic. (2010). "Cancer prevention: 7 steps to reduce your risk. ." from <http://www.mayoclinic.org/cancer-prevention/ART-20044816>.
- Mehrotra, S., L. R. Languino, C. M. Raskett, A. M. Mercurio, T. Dohi and D. C. Altieri (2010). *IAP Regulation of Metastasis*. Cancer Cell **17**(1): 53-64.
- Meissner, T., E. Krause and U. Vinkemeier (2004). *Ratjadone and leptomycin B block CRM1-dependent nuclear export by identical mechanisms*. FEBS Lett **576**(1-2): 27-30.
- Miyamoto, Y., M. Hieda, M. T. Harreman, M. Fukumoto, T. Saiwaki, A. E. Hodel, A. H. Corbett and Y. Yoneda (2002). *Importin alpha can migrate into the nucleus in an importin beta- and Ran-independent manner*. EMBO J **21**(21): 5833-5842.
- Mufti, A. R., E. Burstein, R. A. Csomos, P. C. Graf, J. C. Wilkinson, R. D. Dick, M. Challa, J. K. Son, S. B. Bratton, G. L. Su, G. J. Brewer, U. Jakob and C. S. Duckett (2006). *XIAP Is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders*. Mol Cell **21**(6): 775-785.
- Murakami, N., Y. Ye, M. Kawanishi, S. Aoki, N. Kudo, M. Yoshida, E. E. Nakayama, T. Shioda and M. Kobayashi (2002). *New Rev-transport inhibitor with anti-HIV activity from Valerianae Radix*. Bioorg Med Chem Lett **12**(20): 2807-2810.

Myung, D. S., Y. L. Park, C. Y. Chung, H. C. Park, J. S. Kim, S. B. Cho, W. S. Lee, K. H. Lee, J. H. Lee and Y. E. Joo (2013). *Expression of Livin in colorectal cancer and its relationship to tumor cell behavior and prognosis*. PLoS One **8**(9): e73262.

Nachmias, B., I. Lazar, M. Elmalech, I. Abed-El-Rahaman, Y. Asshab, O. Mandelboim, R. Perlman and D. Ben-Yehuda (2007). *Subcellular localization determines the delicate balance between the anti- and pro-apoptotic activity of Livin*. Apoptosis **12**(7): 1129-1142.

Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner and J. Yuan (2000). *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. Nature **403**(6765): 98-103.

NCI. (2013). from <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/screening/overview/Patient>.

Ndebele, K., P. Gona, T. G. Jin, N. Benhaga, A. Chalah, M. Degli-Esposti and R. Khosravi-Far (2008). *Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced mitochondrial pathway to apoptosis and caspase activation is potentiated by phospholipid scramblase-3*. Apoptosis **13**(7): 845-856.

Olsson, M. and B. Zhivotovsky (2011). *Caspases and cancer*. Cell Death Differ **18**(9): 1441-1449.

Patel, S. S., B. J. Belmont, J. M. Sante and M. F. Rexach (2007). *Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex*. Cell **129**(1): 83-96.

Peter Liston, W. G. F., N. Lynn Kelly, Shingo Toji, Toshiaki Miyazaki, Damiano Conte, Katsuyuki and C. G. C. Tamai, Michael W. McBurney and Robert G. Korneluk (2001). *Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity*. Nature Cell Biology **3**.

Proskuryakov, S. Y., A. G. Konoplyannikov and V. L. Gabai (2003). *Necrosis: a specific form of programmed cell death?* Exp Cell Res **283**(1): 1-16.

Quinn L. Deveraux, E. L., Henning R. Stennicke, Kate Welsh, Guy S. Salvesen and John C. Reed1 (1999). *Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases*. The EMBO Journal **18**(19): 5242-5251.

Rao, L., D. Perez and E. White (1996). *Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis*. J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1441-1455.

Richards, S. A., K. L. Carey and I. G. Macara (1997). *Requirement of guanosine triphosphate-bound ran for signal-mediated nuclear protein export*. Science **276**(5320): 1842-1844.

Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 897-907.

Rigaud, S., M. C. Fondaneche, N. Lambert, B. Pasquier, V. Mateo, P. Soulas, L. Galicier, F. Le Deist, F. Rieux-Laucat, P. Revy, A. Fischer, G. de Saint Basile and S. Latour (2006). *XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome*. Nature **444**(7115): 110-114.

Rosorius, O., P. Heger, G. Stelz, N. Hirschmann, J. Hauber and R. H. Stauber (1999). *Direct observation of nucleocytoplasmic transport by microinjection of GFP-tagged proteins in living cells*. Biotechniques **27**(2): 350-355.

Russell, J. C., H. Whiting, N. Szuflita and M. A. Hossain (2008). *Nuclear translocation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) determines cell fate after hypoxia ischemia in neonatal brain*. J Neurochem **106**(3): 1357-1370.

Saleem, M., M. I. Qadir, N. Perveen, B. Ahmad, U. Saleem, T. Irshad and B. Ahmad (2013). *Inhibitors of Apoptotic Proteins: New Targets for Anticancer Therapy*. Chemical Biology & Drug Design **82**(3): 243-251.

Sanna, M. G., C. S. Duckett, B. W. Richter, C. B. Thompson and R. J. Ulevitch (1998). *Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP*. Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6015-6020.

Srinivasula, S. M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (1998). *Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization*. Molecular Cell **1**(7): 949-957.

Srinivasula, S. M. and J. D. Ashwell (2008). *IAPs: What's in a Name?* Molecular Cell **30**(2): 123-135.

Stauber, R. H., W. Mann and S. K. Knauer (2007). *Nuclear and Cytoplasmic Survivin: Molecular Mechanism, Prognostic, and Therapeutic Potential*. Cancer Research **67**(13): 5999-6002.

Stewart, M. (2007). *Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle*. Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 195-208.

Strambio-De-Castillia, C., M. Niepel and M. P. Rout (2010). *The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation*. Nat Rev Mol Cell Biol **11**(7): 490-501.

Straszewski-Chavez, S. L., I. P. Visintin, N. Karassina, G. Los, P. Liston, R. Halaban, A. Fadiel and G. Mor (2007). *XAF1 Mediates Tumor Necrosis Factor- α -induced Apoptosis and X-linked Inhibitor of Apoptosis Cleavage by Acting through the Mitochondrial Pathway*. Journal of Biological Chemistry **282**(17): 13059-13072.

Strawn, L. A., T. Shen, N. Shulga, D. S. Goldfarb and S. R. Wentz (2004). *Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport*. Nat Cell Biol **6**(3): 197-206.

Sun, Q., Y. P. Carrasco, Y. Hu, X. Guo, H. Mirzaei, J. Macmillan and Y. M. Chook (2013). *Nuclear export inhibition through covalent conjugation and hydrolysis of Leptomycin B by CRM1*. Proc Natl Acad Sci U S A **110**(4): 1303-1308.

Tanaka, C., K. Uzawa, T. Shibahara, H. Yokoe, H. Noma and H. Tanzawa (2003). *Expression of an inhibitor of apoptosis, survivin, in oral carcinogenesis*. J Dent Res **82**(8): 607-611.

Teitz, T., T. Wei, M. B. Valentine, E. F. Vanin, J. Grenet, V. A. Valentine, F. G. Behm, A. T. Look, J. M. Lahti and V. J. Kidd (2000). *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN*. Nature Medicine **6**(5): 529-535.

Tse, M. K., C. K. Cho, W. F. Wong, B. Zou, S. K. Hui, B. C. Wong and K. H. Sze (2012). *Domain organization of XAF1 and the identification and characterization of XIAP(RING) - binding domain of XAF1*. Protein Sci **21**(10): 1418-1428.

Tse, M. K., S. K. Hui, Y. Yang, S. T. Yin, H. Y. Hu, B. Zou, B. C. Wong and K. H. Sze (2011). *Structural analysis of the UBA domain of X-linked inhibitor of apoptosis protein reveals different surfaces for ubiquitin-binding and self-association*. PLoS One **6**(12): e28511.

van de Sluis, B., P. Muller, K. Duran, A. Chen, A. J. Groot, L. W. Klomp, P. P. Liu and C. Wijmenga (2007). *Increased activity of hypoxia-inducible factor 1 is associated with early embryonic lethality in Commd1 null mice*. Mol Cell Biol **27**(11): 4142-4156.

van De Sluis, B., J. Rothuizen, P. L. Pearson, B. A. van Oost and C. Wijmenga (2002). *Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population*. Hum Mol Genet **11**(2): 165-173.

Varfolomeev, E., E. Moradi, Jasmin N. Dynek, J. Zha, Anna V. Fedorova, K. Deshayes, Wayne J. Fairbrother, K. Newton, J. Le Couter and D. Vucic (2012). *Characterization of ML-IAP protein stability and physiological role in vivo*. Biochemical Journal **447**(3): 427-436.

Vaux, D. L. and J. Silke (2005). *IAPs, RINGs and ubiquitylation*. Nature Reviews Molecular Cell Biology **6**(4): 287-297.

Vegran, F., R. Boidot, F. Bonnetain, M. Cadouot, S. Chevrier and S. Lizard-Nacol (2011). *Apoptosis gene signature of Survivin and its splice variant expression in breast carcinoma*. Endocr Relat Cancer **18**(6): 783-792.

Vinay Kumar, T. C. a. S. L. R. (1998). Robbins Pathologic Basis of Disease.

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). *Cancer genes and the pathways they control*. Nature Medicine **10**(8): 789-799.

Vucic, D., K. Deshayes, H. Ackerly, M. T. Pisabarro, S. Kadkhodayan, W. J. Fairbrother and V. M. Dixit (2002). *SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP)*. J Biol Chem **277**(14): 12275-12279.

Vucic, D., H. R. Stennicke, M. T. Pisabarro, G. S. Salvesen and V. M. Dixit (2000). *ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas*. Curr Biol **10**(21): 1359-1366.

Vucic, M. C. d. A. a. D. (2012). *IAPs are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy.pdf*. Exp. Oncology **34**(3): 200-211.

Wang, R. and M. G. Brattain (2007). *The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa*. FEBS Lett **581**(17): 3164-3170.

Weinberg, R. A. (2014). The biology of cancer.

Wen, W., J. L. Meinkoth, R. Y. Tsien and S. S. Taylor (1995). *Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus*. Cell **82**(3): 463-473.

Wente, S. R. and M. P. Rout (2010). *The nuclear pore complex and nuclear transport*. Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(10): a000562.

WHO. (2012). from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.

Wörth, C. C. T. (2000). Entwicklung eines Nachweis-Verfahrens für DNA-Addukte basierend auf Fluoreszenzderivatisierung und Kapillarelektrophoretischer Trennung.

Wu, Z., Q. Jiang, P. R. Clarke and C. Zhang (2013). *Phosphorylation of Crm1 by CDK1-cyclin-B promotes Ran-dependent mitotic spindle assembly*. Journal of Cell Science **126**(15): 3417-3428.

Wyllie, A. H. (2010). *"Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology*. Mol Neurobiol **42**(1): 4-9.

Wyllie, A. H., J. F. Kerr and A. R. Currie (1980). *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol **68**: 251-306.

Xia, Y., R. Novak, J. Lewis, C. S. Duckett and A. C. Phillips (2006). *Xaf1 can cooperate with TNF α in the induction of apoptosis, independently of interaction with XIAP*. Molecular and Cellular Biochemistry **286**(1-2): 67-76.

Yagihashi, A., K. Asanuma, D. Kobayashi, N. Tsuji, T. Torigoe, N. Sato and N. Watanabe (2005). *Autoantibodies to survivin in patients with chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma*. Autoimmunity **38**(6): 445-448.

Yan, B. (2011). *Research progress on Livin protein: an inhibitor of apoptosis*. Molecular and Cellular Biochemistry **357**(1-2): 39-45.

Yang, D., X. Song, J. Zhang, L. Ye, S. Wang, X. Che, J. Wang, Z. Zhang, L. Wang and W. Shi (2010). *Therapeutic potential of siRNA-mediated combined knockdown of the IAP genes (Livin, XIAP, and Survivin) on human bladder cancer T24 cells*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica **42**(2): 137-144.

Ye, Y. and B. Li (2006). *1'S-1'-acetoxychavicol acetate isolated from Alpinia galanga inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by blocking Rev transport*. J Gen Virol **87**(Pt 7): 2047-2053.

Zhivotovsky, B. (2004). *Apoptosis, necrosis and between*. Cell Cycle **3**(1): 64-66.

Ziegler, U. and P. Groscurth (2004). *Morphological features of cell death*. News Physiol Sci **19**: 124-128.

Zou, B., C. S. Chim, R. Pang, H. Zeng, Y. Dai, R. Zhang, C. S. C. Lam, V. P. Y. Tan, I. F. N. Hung, H. Y. Lan and B. C. Y. Wong (2012). *XIAP-associated factor 1 (XAF1), a novel target of p53, enhances p53-mediated apoptosis via post-translational modification*. Molecular Carcinogenesis **51**(5): 422-432.

Zou, H., R. Yang, J. Hao, J. Wang, C. Sun, S. W. Fesik, J. C. Wu, K. J. Tomaselli and R. C. Armstrong (2003). *Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP*. J Biol Chem **278**(10): 8091-8098.